

BRAIN

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

平成16年11月15日発行（隔月1回15日発行）

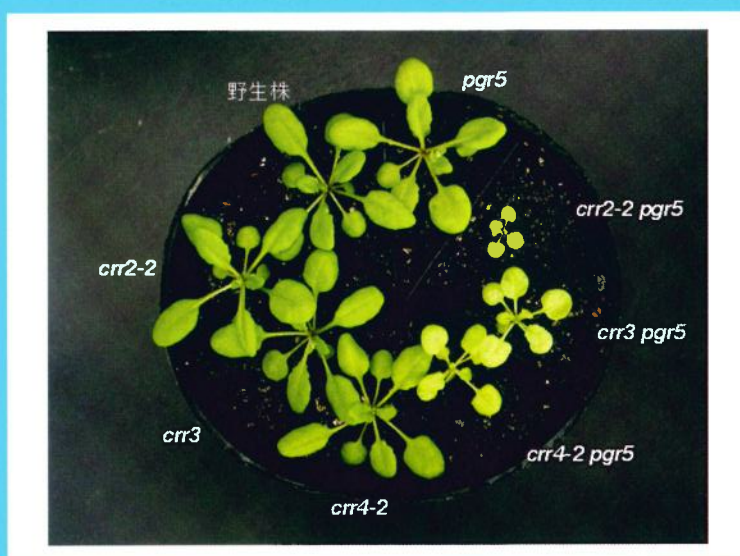
ISSN 1345-5958

TECHNO NEWS

No.106

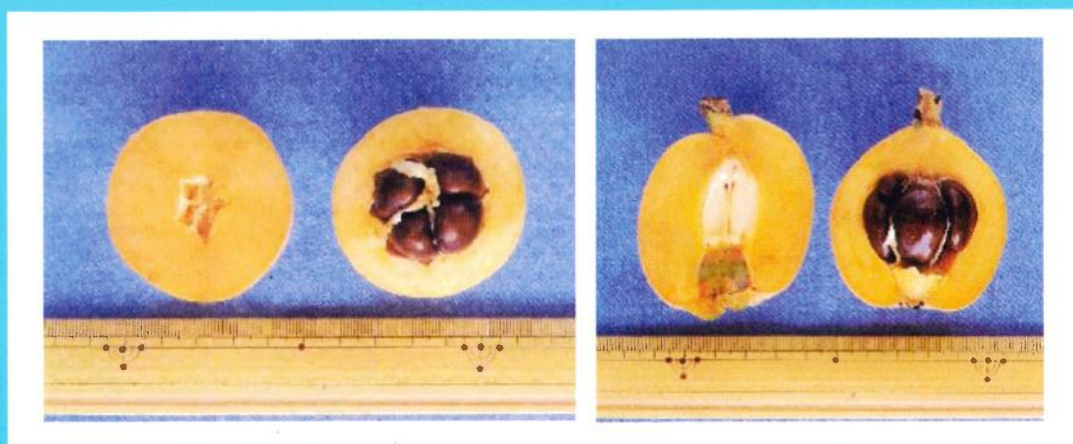
15 NOVEMBER, 2004

ブレインテクノニュース



光化学系Ⅰサイクリック電子伝達変異株の表現型

九州大学 農学研究院
鹿内 利治



種子なしビワ‘希房’の横断面及び縦断面

千葉県農業総合研究センター 暖地園芸研究所

八幡 茂木

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

目 次

総 説

- 硝酸同化効率向上による植物の代謝機能の増進?亜硝酸トランスポーター (CsNitr1) の
発見と CsNitr1形質転換植物による大気中NO₂の吸収…………… 1
高橋 正昭 (大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科)

国内情報

- 光合成電子伝達の温故知新…………… 5
鹿内 利治 (九州大学 農学研究院)
- 植物の自己防衛システムを制御する液胞プロセシング酵素の発見と機能解明…………… 10
初谷 紀幸^{1, 2}・黒柳 美和^{1, 2}・山田 健志²・飯 哲夫³・西村 幹夫²・西村 いくこ¹
(¹京都大学大学院理学研究科, ²自然科学研究機構 基礎生物学研究所, ³(独)農業生物資源研究所)
- ニジマスを生むヤマメの作出: 魚類始原生殖細胞を用いた発生工学…………… 14
吉崎 悟朗^{1, 2}・竹内 裕¹・小林 輝正¹・高柴 邦子¹・奥津 智之¹・竹内 俊郎¹
(¹東京海洋大学 海洋科学部, ²科学技術振興機構 さきがけ研究21)
- サツマイモ茎からの内生窒素固定細菌の分離・同定と茎中生息の確認…………… 19
安達 克樹・Constancio A. Asis, Jr. ((独)農業・生物系特定産業技術研究機構 九州
沖縄農業研究センター畑作研究部)
- 高品質なたい肥生産を求めて…………… 24
原田 泰弘・道宗 直昭 ((独)農業・生物系特定産業技術研究機構 生物系特定産業技術
研究支援センター)
- 不定胚経由のスギ個体再生技術の開発…………… 29
伊ヶ崎 知弘・篠原 健司 ((独)森林総合研究所 生物工学研究領域)

地域の先端研究

- 世界で初, 種子なしビワの開発…………… 33
八幡 茂木 (千葉県農業総合研究センター 暖地園芸研究所)
- 3 倍体無核スダチ新品種 '徳島 3 X 1 号' について…………… 36
徳永 忠士 (徳島県立農林水産総合技術センター 果樹研究所)
- 倍数性合成周縁キメラによる種なし香酸かんきつの開発…………… 39
脇塚 巧・井上 (稲田) 絵理子・西山 聡 (全農愛媛県本部 青果事業部)

文献情報

- 大麦のウドンコ病耐性機構とその起源…………… 42
P. Piffalll et al. (*Nature*, 430, 887-891, 2004) 抄訳: 岩井 純夫
- 3次元ゲル培養システムによるウシ胚盤胞の体外での伸長期胚への発育…………… 43
G. Vajta et al. (*Theriogenology*, 62: 1253-1263, 2004) 抄訳: 下司 雅也
- 酸素濃度を高めた人工海水中でのホタテ閉殻筋の貯蔵…………… 44
N. Seki et al. (*Journal of Food Science*, (69)4, FCT262-267, 2004) 抄訳: 木村 郁夫

表紙写真説明

(上段) 弱光で生育させたシロイヌナズナ野生株, *pgr5*, *crr*変異株群 (*crr2-2*, *crr3*, *crr4-2*) の間に生育の差はないが, 二重変異体 (*crr2-2 pgr5*, *crr3 pgr5*, *crr4-2 pgr5*) は光合成電子伝達の異常により著しい生育障害を示した。

(下段) 種子なしビワの果実断面を見ると, 中心部分に空洞ができるものの, 果肉の厚さは1.5~2倍に増加した。

詳細については, それぞれ5頁, 33頁をご覧ください。

◀国内情報▶

硝酸同化効率向上による植物の代謝機能の増進 —亜硝酸トランスポーター (CsNitr1) の発見と CsNitr1形質転換植物による大気中NO₂の吸収—

大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻
高橋正昭・ススチプリヤトノ・杉浦美羽

植物による硝酸同化は、細胞質の硝酸還元と葉緑体の亜硝酸還元の2段階の反応で構成される。我々は中間代謝物である亜硝酸の葉緑体への移行がH⁺に依存した能動輸送であることを明らかにし、亜硝酸トランスポーター cDNA (CsNitr1) を緑化中のキュウリの子葉からクローニングした。CsNitr1形質転換により植物の硝酸同化効率が向上し、シロイヌナズナでは大気中のNO₂を野生型の1.3倍効率良く吸収し、CO₂吸収も1.7倍に増えていた。硝酸同化効率が亜硝酸の速い輸送によって高められ、その結果CO₂固定も促進されたと考えられる。

1. はじめに

Nは生体成分を構成する主要な元素である。生体重量の約3%を占める還元型有機態Nがやがて細菌により加水分解されてできたアンモニア、更に酸化されてできたN₂、および、硝酸を含めた種々の化学形態のN化合物は再びアミノ酸等の有機態Nに還元される。このNサイクルにおいて最も酸化の進んだ硝酸態Nからアンモニア態Nを生成する硝酸還元は植物やカビ、および、細菌によって行われ、特に植物の硝酸同化過程は、光合成電子伝達系から供給された8電子を利用する還元反応であり、Nサイクルの回転に必要な自由エネルギーを供給している。

N同化で基質となる硝酸イオンは土壤中から吸収したものである。根の表皮細胞にある硝酸トランスポーターがこの負電荷を持つ硝酸イオンの植物体内への取り込みに関与している。塩素酸系除草剤に対して耐性を付与する変異の原因となる遺伝子からこの硝酸を水素イオンと共輸送するトランスポーターの存在と機能が明らかにされた¹⁾。根に取り込まれた硝酸の一部は根の細胞内で、大部分は導管に送り込まれて地上部に蒸散流で運ばれて葉肉細胞に運ばれる。

TAKAHASHI Masaaki, SUSTIPRIJATNO,

SUGIURA Miwa

〒599-8531 大阪府堺市学園町1-1

幾つかの組織の形質膜を通過するために、根の硝酸トランスポーターのアイソフォームが機能していると考えられ、実際硝酸トランスポーターと高いアミノ酸配列の相同性を持つアイソフォームがゲノム解析で見ついている。

硝酸のアンモニアへの還元は連続する2段階の反応で進行する。まず、硝酸がNADHを電子供与体として利用する硝酸還元酵素 (NR) により2電子還元を受ける。生成した亜硝酸は、次いで、還元型のフェレドキシンを電子供与体として用いる亜硝酸還元酵素 (NiR) によりアンモニアに変換される。NRとNiRの細胞内局在性から、硝酸から亜硝酸への還元は細胞質で、亜硝酸からアンモニアへの6電子還元は緑葉では葉緑体で、非光合成組織ではプラスチドで行われる。硝酸の還元同化は、このように2つの酵素の関与する直列に繋がった2段階の反応で構成される。細胞毒性があまり高くない硝酸の細胞内濃度は比較的高く、植物種によっては液胞の膨圧を調節するために高い濃度で硝酸を貯蔵しているものもあり、NRのK_m (~0.2 mM) よりも高い濃度で存在すると考えられ、活性型のNRのタンパク質量のみに反応速度が依存している。NRの修飾などにより活性型と不活性型の比率を調節して硝酸同化をコントロールしているのは、硝酸の細胞内濃度が基質レベルによる調節ができる濃度領域を超えているためである。一方、硝酸還元の産物である亜硝酸の細

胞内濃度は極めて低く、硝酸の1/1,000程度しかない²⁾。反応の場である葉緑体ストロマでの亜硝酸の濃度はわからないが、NiRのK_m (~0.1 mM) よりはずっと低いと推定される。すなわち、亜硝酸を葉緑体へ効率よく輸送すれば、硝酸同化のオーバーオールに直接影響し、効率の向上が期待される。

2. 亜硝酸の葉緑体への輸送機構

亜硝酸を細胞質から葉緑体へ輸送する細胞輸送機構については、2つの全く異なる説明があった。単離葉緑体は亜硝酸を吸収利用できるが、この亜硝酸の吸収には光照射が必要なことから、亜硝酸の能動輸送が提唱されていた。一方、葉緑体包膜で再構成した小胞内部のpHを測定して、小胞外に添加した亜硝酸により酸性化が起こることから、単純拡散により亜硝酸(HNO₂)が細胞質から葉緑体に移行しているとする結果も示された。しかしながら、単純拡散のみで葉緑体の亜硝酸還元をサポートするためには、少なくとも、細胞質に10 mM以上の高濃度の亜硝酸が定常的に存在することが必須であり、現実とは一致しない。また、光照射が亜硝酸の取り込みに必要であるとしても、葉緑体内では亜硝酸の還元による消費が同時に生じている条件では、消費によるシンク効果に依存した吸収であることも排除できない。我々は、まず、光照射のない条件で、単離葉緑体による亜硝酸の吸収を葉緑体内に取り込まれた亜硝酸を直接測定することにより調べ、葉緑体外が酸性のpH勾配によって駆動される能動輸送であることを証明した(図1)。単離葉緑体を亜硝酸と混合すると早い吸収があり、約10 secでピークとなる。その時の葉緑体内亜硝酸濃度は葉緑体外の濃度の4倍を越し、濃度勾配に逆らって亜硝酸が移動していた。この一時的な吸収が過ぎると葉緑体内から亜硝酸が流出し、60 min後には包膜内外の濃度が等しい平衡に達した³⁾。亜硝酸のpKが3.35であることを考慮すると、電荷を持たない酸の単純拡散であれば、酸

性側ではますます早くなるはずである。しかし、pH 5.5で最も早い吸収を示し、それより酸性側では速度は明らかに遅くなっており、単離した葉緑体のストロマpH値に近い中性域では全く吸収が認められなかった。亜硝酸の葉緑体への移行が、包膜外が酸性のpH勾配を駆動力とするトランスポーターによる能動輸送であることが明らかとなった。根の硝酸の吸収に関与している硝酸トランスポーターが水素イオンと硝酸の共輸送を行う機構を持っていることとよく似ている。亜硝酸の葉緑体への取り込み速度のpH依存性のパターンの解析より、少なくとも2原子の水素イオンが1分子の亜硝酸の輸送と共役していると推察している³⁾。生理的な条件では、ストロマのpHは光合成の電子伝達系が働いているときには高くなり、一方、細胞質のpHはほぼ中性に保たれているが、包膜にもH⁺-ATPaseの存在が示唆されているので、包膜の表面では局所的な酸性領域が造られて、亜硝酸イオンの取り込みに使われている可能性も考えられる。

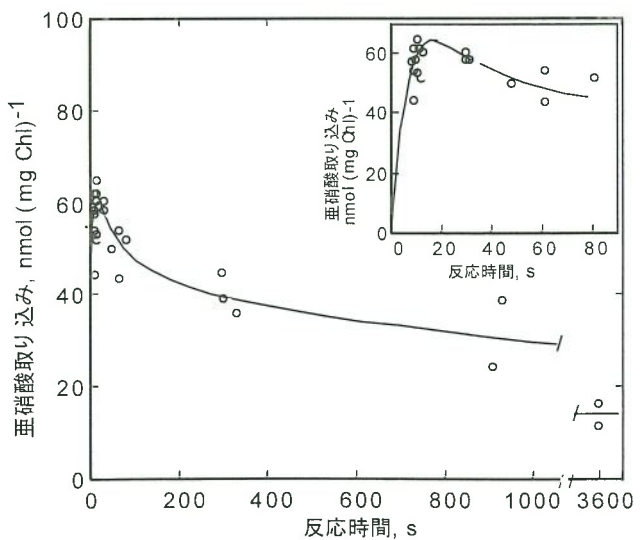


図1 ホウレンソウ単離葉緑体による亜硝酸の取り込み

ホウレンソウ単離葉緑体を10 μM亜硝酸カリウムと混合した後、横軸に示す時間に葉緑体を分離し取り込まれた亜硝酸を定量した。挿入図は初期の取り込みの速さと葉緑体内亜硝酸蓄積のオーバーシュートを示す混合後の80秒を示す。

亜硝酸イオンの単離葉緑体による取り込みから、葉緑体包膜で機能するH⁺濃度勾配を使う亜硝酸トランスポーターの機能が示唆された。葉緑体内で生成した代謝産物、特に糖やリン酸エステルをシンク組織に転流させる輸送タンパク質は数多く見つかっているが、これまでアミノ酸トランスポーターをはじめとして光合成と共役して進むN代謝の基質や合成産物をシンクに運び出す輸送タンパク質は見つかっていなかった。我々は、緑化中のキュウリ子葉から光合成機能の分化と並行して発現するcDNAの中から、硝酸トランスポーターに相同なアミノ酸配列を持つトランスポーターcDNAをクローニングした。このトランスポーターは葉緑体包膜に局在し、機能解析の結果、efflux型の亜硝酸トランスポーターであることを明らかにし、キュウリ (*Cucumis sativus* L) の亜硝酸トランスポーターからCsNitr1と名付けた (EMBLアクセッションNo.Z69370)。

3. CsNitr1形質転換植物が示す機能

CsNitr1をCaMV35Sプロモーターとセットにして導入し作成したCsNitr1形質転換タバコは、非形質転換株の生育に最適なN施肥量でN過剰症状を示した。生葉のPAM蛍光解析により、GUS (β-glucuronidase) 遺伝子で形質転換したコントロールのタバコ葉と電子伝達活性を比較すると、Fv/Fmはほぼ同じ約0.4の値を示すことから、光化学系II反応中心の電子伝達活性はCsNitr1の導入によっても変わらないのに対し、CO₂やNO₂還元への電子伝達などに起因する非光化学的なクロロフィル蛍光の消光は、コントロールのGUS形質転換タバコ葉からの蛍光の消光の半減期が21.1 sであるのに対し、CsNitr1形質転換タバコでは7.7 sと非常に速くなり、定常的な光合成の電子伝達速度が大きく促進されていた (図2)。CsNitr1形質転換タバコの示すこの様な形質と電子伝達活性の改善は、期待された亜硝酸の輸送の促進によるN同化系の代謝の効率化が結果として起こったとす

ると良く説明できる。

大気中にはNO₂ガスが含まれており、車の往來の盛んな道路近くでは濃度が高く、人の健康を害する大気汚染ガスである⁴⁾。N(IV)O₂は水に溶けると自発的にN(V)O₃⁻とN(III)O₂⁻に不均化する。これらの分子は共にN同化の基質と中間体であり、気孔を通して葉の細胞中に取り込むことができればN養分として土壤中から供給されるものと変わりなく利用できるはずである。植物のこの機能を活用して大気汚染ガスを浄化する試みが行われてきた⁵⁾。CsNitr1形質

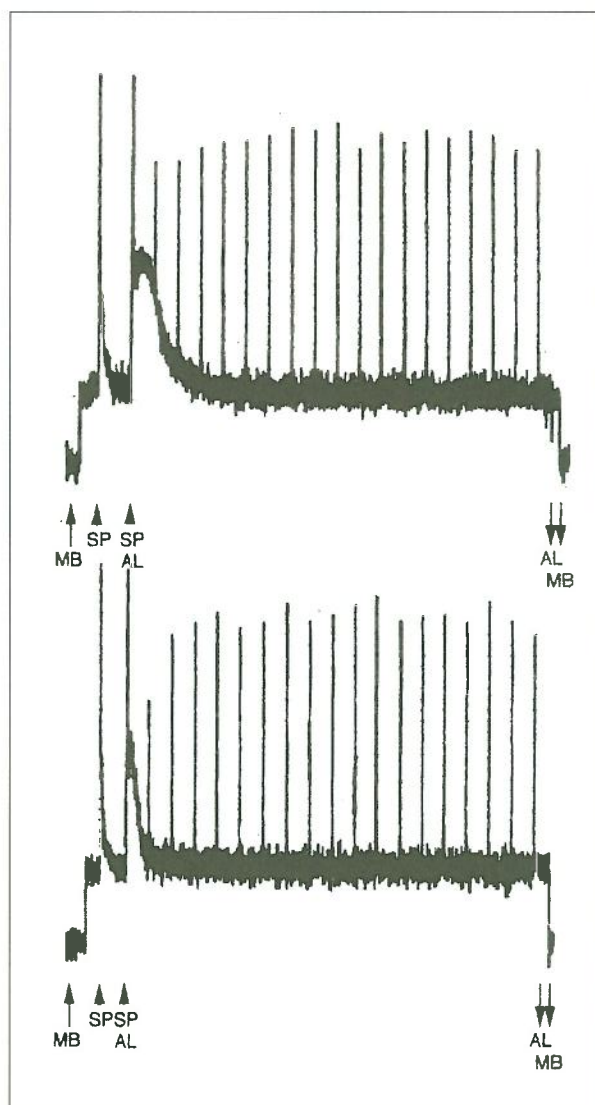


図2 Gus形質転換タバコ、および、CsNitr1形質転換タバコ生葉のクロロフィル蛍光誘導とクエンティング。
(上図) Gus形質転換タバコ (対照試料)、
(下図) CsNitr1形質転換タバコ。

転換植物の持つ高いN同化能は大気中のNO₂の吸収利用にどのような効果を与えるのか、CsNitr1形質転換シロイヌナズナを作成してその大気中NO₂ガス吸収について我々も調べてみた。非形質転換シロイヌナズナはNO₂をCO₂の約1/250の速度で吸収し、その約半分のモル数のNOガスを放出していた。CsNitr1形質転換シロイヌナズナはCO₂、NO₂吸収共に野生型の1.4から1.7倍に増え、一方、NOの放出は吸収したNO₂の約1/4に減少した。野生型で見られたNO₂吸収とNO再放出のモル比2:1は、NOが亜硝酸から生成しているとする⁶⁾、吸収されたNO₂から化学量論的にNOが放出されていることになる(吸収されたNO₂のうち硝酸になったものだけが同化される)。CsNitr1形質転換シロイヌナズナではNO₂の不均化で作られた亜硝酸の半分もN同化系に組み入れられたと推定した。CsNitr1形質転換シロイヌナズナのCO₂吸収も野生型に比較して増えているのは、N同化とC同化が密接に関連していることを示した。

4. おわりに

N代謝に含まれる反応は教科書通りではなく、硝酸や亜硝酸が無機ラジカル分子として種々の酸化還元反応の原因となる。N代謝に関わるトランスポーターの仕事を開始からの10年間に得た素直な感想である。植物が生長のために必要としている養分のほとんどは欠乏時に吸収同化系が発現するのに対し、Nは存在する時に同化系が誘導される⁷⁾。すなわち、N以外の養分は常に環境に潤沢にあって、植物が必要とした時に利用するシステムで、Nはたまたま根圏に見つけた機会に吸収利用し、保存するようになっている。硝酸の同化は初発の反応は細胞質で、続く亜硝酸還元とアミノ酸の合成反応は葉緑体で行われる。葉緑体は共生したラン藻

から進化したものであり、硝酸の同化系は宿主が持っていた硝酸の2電子還元反応と共生生物により持ち込まれた葉緑体の代謝を亜硝酸の移行でつなぎ合わせたシステムである。中間代謝物として絶対的に必要とされるが細胞毒性を持つ亜硝酸の処理がいわば最も重要と考えられる。硝酸が環境に多量に蓄積し始めたのは、おそらく、それほど昔のことではなく、化学合成肥料が環境に持ち込まれた時以降のことであろう。植物がこの急激なN養分環境に自発的な変異で適応進化するためには時間がまだ足りない。亜硝酸の細胞内の移行速度の促進はこの様な環境に対応する新しい機能の一つである。

文 献

- 1) Tsay, Y.-F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A. and Crawford, N. M. (1993), *Cell*, 72, 705-713.
- 2) Kawamura, Y., Takahashi, M., Arimura, G., Isayama, T., Irifune, K., Goshima, N. and Morikawa, H. (1996), *Plant Cell Physiol.*, 37, 878-880.
- 3) Takahashi, M., Haruki, and Sugiura, M., (1998) Photosynthesis: Mechanism and Effects (Gerab, G and Pusztai, J., eds.) pp. 3621-3624, Kluwar Academic.
- 4) Dedon, P. C. and Tannenbaum, S. R. (2004), *Arch. Biochem. Biophys.*, 423, 12-22.
- 5) 森川弘道, 高橋美佐 (2004), 植物代謝ハンドブック (新名惇彦, 吉田和哉監修) pp. 652-674, エヌ・ティー・エス.
- 6) 坂本敦, 松原俊之, 高橋美佐, 森川弘道 (2004) 日本農芸化学会誌, 78, 958-961.
- 7) Crawford, N. M. and Arst, Jr., H. N. (1993) *Annu. Rev. Genet.*, 27, 115-146.

◀国内情報▶

光合成電子伝達の温故知新

九州大学 農学研究院
鹿内利治

光化学系Iサイクリック電子伝達は、植物の葉緑体で光のエネルギーからATPを合成する反応である。その存在は半世紀前に明らかにされていながら、生理機能、それに関わる遺伝子は不明であった。シロイヌナズナを用いた分子遺伝学の導入により、この謎の電子伝達が、植物の強光に対する反応と光合成に極めて重要な働きをすることが明らかになった。

1. 直線的電子伝達で説明される明反応の大枠

光合成は太陽の光エネルギーを生命が利用できる糖などに変換する過程である。植物のみならず、ほとんどすべての生命が食物連鎖を通じて光合成に依存して生きている。また光合成は、大気中の二酸化炭素を固定する過程であり、人類にとって急務の地球温暖化の問題にも直接絡んでいる。光合成明反応は、直接光エネルギーの変換に関わり、変換したエネルギーを利用して二酸化炭素の固定などを行うのが暗反応である。明反応の実体は、葉緑体（光合成を行う植物に固有の細胞内小器官）内のチラコイド膜と呼ばれる膜上の電子伝達である（図1）。この電子伝達は二つの光化学反応（光のエネルギーを変換する反応）で駆動される。この反応の最大のポイントは、光化学系IIにおいて水から電子

SHIKANAI Toshiharu

〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

が引き抜かれ酸素を発生する点である。この水から引き抜かれた電子は、光化学系Iの駆動力を借りて、最終的にはNADPH（物質の還元に使われる補酵素）として蓄えられる。電子伝達に伴い、チラコイド膜の外側（ストロマ、暗反

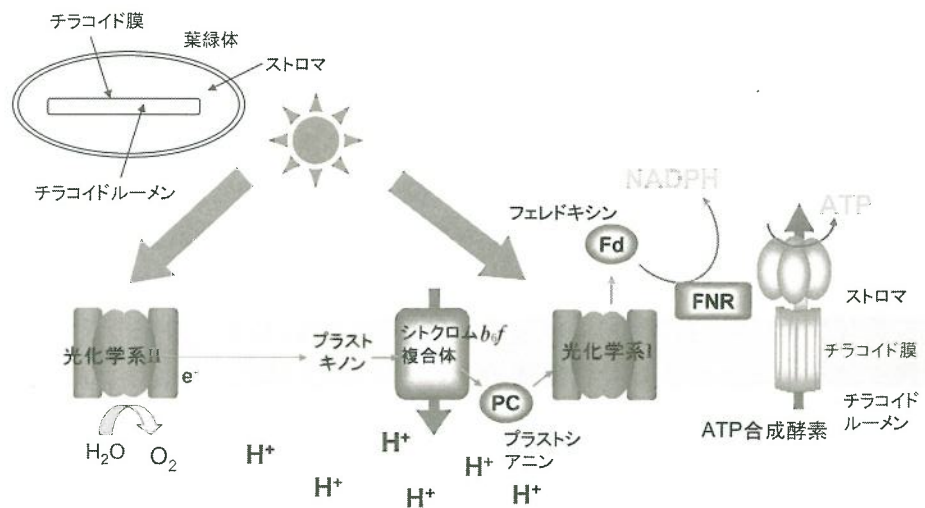


図1 直線的電子伝達の概略図

左上は葉緑体の構造を模式化したものである。中央の図は、チラコイド膜上の電子伝達装置を示している。

応の起こる場所）から内側（チラコイドルーメン）に水素イオンの取り込みが起きる。この水素イオンの勾配を使ってATP合成が行われる。したがって、明反応の最終産物は、NADPHとATPであり、これを手に入れることにより本質的には酵素反応である暗反応を動かすことができる。このように明反応の大枠は、水から

NADPHへの直線的電子伝達で説明される。

2. 謎の光化学系 I サイクリック電子伝達

今から半世紀前、直線的電子伝達概念が確立される前のこと、光合成明反応の本質に関わる画期的発見があった。抽出した葉緑体にフェレドキシン (NADPHの様に電子を蓄える物質) を加えるとATPができるのである。この反応は、光化学系 I サイクリック電子伝達と呼ばれ、1) 光化学系 I だけで駆動され、2) NADPHの蓄積なしにATPを合成できる点が、直線的電子伝達と異なる (図2)。このように、光化学系 I 電子伝達は、明反応の最も本質的部分に関わる。しかし、その生理的意義は謎であった。光化学系 I 電子伝達の大きさを植物体で評価する方法がなかったこと (入口、出口のないものは測りにくい)、そのことにも関係して、電子伝達に関わる遺伝子が長いこと明らかにならなかった点が、研究を遅らせた理由である。また、直線的電子伝達概念が美しく、明反応を説明するのに充分であったことも少なからず影響したと思われる。

3. 水素イオン勾配のもう一つの役割

光は光合成に必須であるが、過剰な光エネルギーの受容は活性酸素の生成を招き、光障害 (光合成装置の破壊) を引き起こす。光の過剰は単純に光強度に依存するのではなく、低温や乾燥などのストレス下で光エネルギーの利用 (暗反応) の効率が下がると、比較的弱い光強度でも起きる。恒常的な光の過剰下では、植物は光合成装置を変化させ、光の利用効率を低下させる。これは光馴化と呼ばれる長期的適応戦略である。しかし自然界では光強度は一定ではなく、光の過剰と不足が秒、分の単位で入れ代わる。このような条件下で、光障害を恐れるあまり、光の利用効率を下げる消極的な適応戦略をとることは、光強度が低下した際の光合成効率を下げる結果になる。したがって、植物は、秒から分のオーダーで光の利用効率を調節する迅速適応を持つ。この迅速適応には、遺伝子発現の変化を介して光合成装置を作り変える時間的な余裕はなく、光馴化とは本質的に異なるものである。

高等植物の迅速適応において最も効果的に機能するのは、過剰な光エネルギーを光化学系 II から安全に熱として捨てる方法である。熱散逸

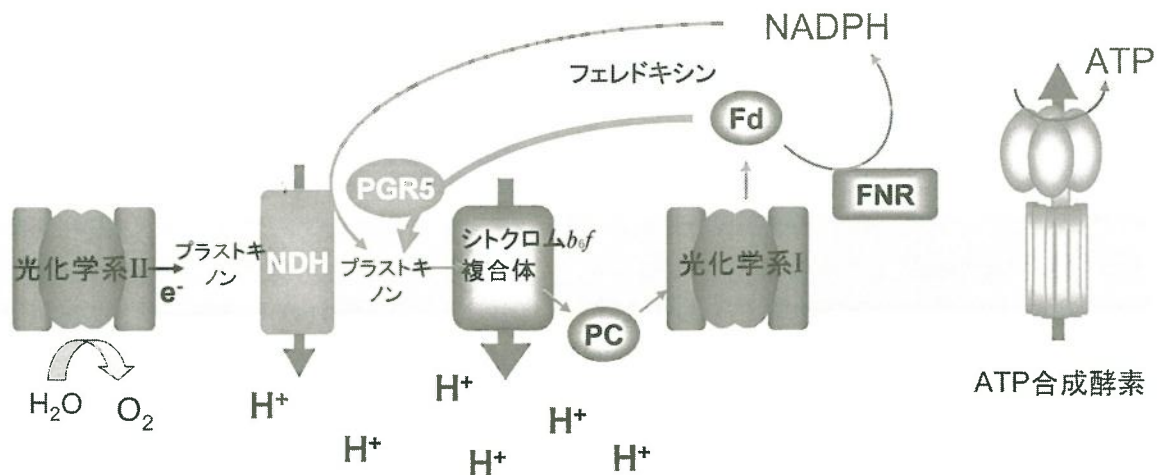


図2 光化学系 I サイクリック電子伝達の概略図
PGR5依存とNDH依存の二経路が存在する

と呼ばれるこの適応は、せっかく集めた光エネルギーを熱にして捨ててしまうので、弱光下では邪魔ものである。したがって、その誘導は光の過剰をモニターすることで制御されねばならない。植物が光の過剰を測る方法は巧妙で、光照射で誘導される水素イオン勾配、正確にはチラコイド膜ルーメン側の酸性化をモニターしている。強光下で電子伝達量の増加によりルーメンが強く酸性化すると、光化学系Ⅱに存在するpHセンサーがそれを感じ、熱散逸が誘導される。近年分子遺伝学の導入により、熱散逸誘導制御のpHセンサーが解明され、実際の植物の光環境適応においてこの制御が極めて重要な機能を持つことが明らかになった。しかし熱散逸は、これまでの植物の環境適応能強化の試みであまり注目されていない。

4. 光化学系Ⅰサイクリック電子伝達は熱散逸の誘導に必須である

前述のように光化学系Ⅰサイクリック電子伝達は、チラコイド膜を介した水素イオン勾配を形成する電子伝達である。したがって、この電子伝達がチラコイドルーメン酸性化を介して熱散逸の誘導を制御しているという考えは比較的以前からあった。熱散逸誘導の分子機構解明は、クラミドモナスとシロイヌナズナ（それぞれ単細胞緑藻と高等植物で、いずれもゲノム解析が終了したモデル植物）を使って変異株が単離されたことがブレークスルーになった。変異株単離を可能にしたのが、熱散逸を可視化するクロロフィル蛍光イメージングの技術である（図3）。光化学系Ⅰサイクリック電子伝達が熱散逸の誘導に必須なら、その変異

株は、やはりクロロフィル蛍光イメージングを利用して単離されるはずである。シロイヌナズナ *pgr5* (*proton gradient regulation*) は、こうして熱散逸誘導能を欠く変異株として得られた。

*pgr5*に異常があったのは、半世紀前に発見された光化学系Ⅰサイクリック電子伝達であった。この謎の経路が、熱散逸の誘導に必須な水素イオン勾配形成に機能していることが明らかになった。さらに *pgr5*は、熱散逸の誘導装置を欠く変異株以上に強光に弱い事実が明らかになった。その生理機構を詳しく解説するスペースはないが、光化学系Ⅰサイクリック電子伝達は、高等植物の強光からの防御に極めて重要な働きをしていることが明らかになったり。光化学系Ⅰサイクリック電子伝達の生理機能が初めて実験的に明確に示されたのである。

5. 光化学系Ⅰサイクリック電子伝達は光合成に必須である

変異株の取得により生理的重要性が明らかになったPGR5依存経路に加えて、高等植物の光化学系Ⅰサイクリック電子伝達には、NDH複合体に依存する経路が知られている（図2）。NDH依存経路は、90年代にラン藻で発見されている。NDH複合体はもともと呼吸鎖で機能

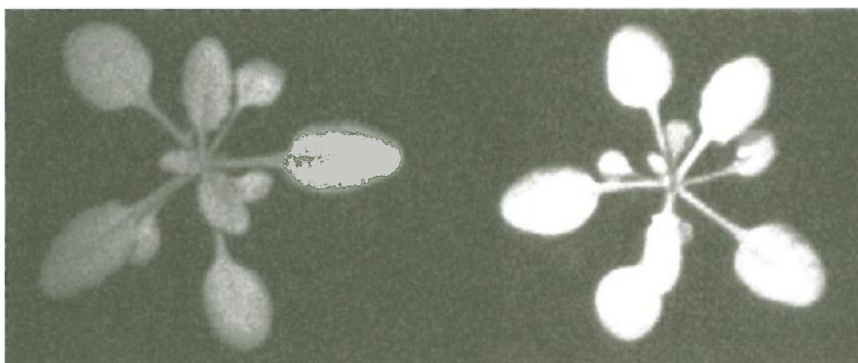


図3 クロロフィル蛍光イメージング

クロロフィル蛍光は光化学系Ⅱから出る特殊な光。CCDカメラ下で画像化できる。右の *pgr5* は熱散逸が誘導できないため、左の野生株に比べて蛍光が高い。

する複合体であるが、葉緑体はラン藻の持っていた呼吸鎖の一部を光化学系 I サイクリック電子伝達の装置として残したのである。葉緑体形質転換を利用したタバコでのNDH複合体遺伝子のノックアウトは（複合体遺伝子は葉緑体ゲノムにコードされる。）、植物にわずかな影響しか与えなかった。NDH依存経路はストレス下で貢献するようだが、その寄与の大きさには疑問を残す結果となった。

分子遺伝学にはredundancy（遺伝子の機能重複とでも訳されるか？）という言葉がある。多くの現象には複数の遺伝子が機能を重複して関わっており、そのような場合、強い表現型はすべての遺伝子を破壊した二重（多重）変異体でのみ観察される。光化学系 I サイクリック電子伝達のPGR5依存経路とNDH依存経路は、一部重複しているものの、多くの面で生理的に異なっており、単純なredundancy（この場合遺伝子機能ではなく電子伝達経路の重複）を考えるとできない。しかし、一方の変異株では、もう一つの経路が機能を相補していることは充分考えられる。したがって二重変異体の解析が重要な課題であった。我々はクロロフィル蛍光イメージングを改良し、シロイヌナズナでNDH複合体の活性を欠く核遺伝子の変異株を単離した²⁾。シロイヌナズナでは葉緑体形質転換が困難で、直接複合体遺伝子をノックアウトすることができなかったからである。シロイヌナズナでのNDH複合体活性を欠く複数の*crr*（*chlororespiratory reduction*）変異株の単離は、*pgr5*との二重変異体の作成を可能にし

た。*pgr5*は強光に対する反応が異常なものの、弱光下では正常な生育を示す。また*crr*変異株群は、ほとんど野生株と変わらない。しかしながら、二重変異体は弱光下から著しい光合成電子伝達の異常を示し、光障害と生育障害を示した（図4）³⁾。これは、*pgr5*の示した強光に対する反応異常の延長線上で説明できるものではない。

予想外であったが、この二重変異体の表現型は、半世紀前、光化学系 I サイクリック電子伝達が発見された当時のアイデアが正しいことを証明している。何度も述べるように光化学系 I サイクリック電子伝達は、チラコイド膜を介した水素イオン勾配を形成する電子伝達である。この勾配は強光下で、熱散逸を誘導するのに必須であった。しかしながらそれだけではなく、光化学系 I サイクリック電子伝達により形成される水素イオン勾配は、光合成が必要とするATPを供給するのに必須だったのである。冒頭で解説した直線的電子伝達だけでは、光合成

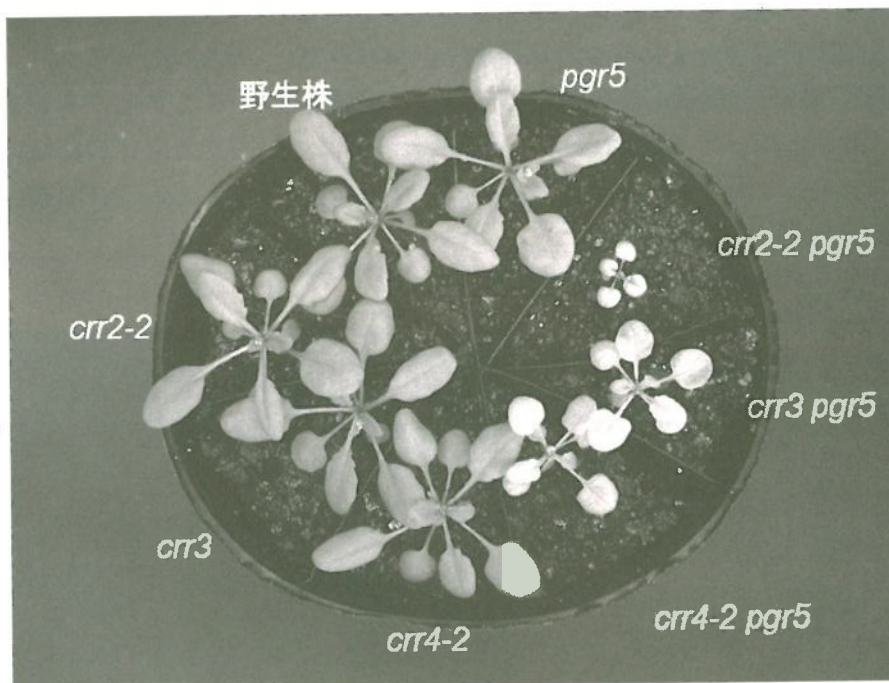


図4 光化学系 I サイクリック電子伝達変異株の表現型
弱光で生育させた野生株、*pgr5*、*crr*変異株群（*crr2-2*、*crr3*、*crr4-2*）に生育の差は見られない。一方、二重変異体（*crr2-2 pgr5*、*crr3 pgr5*、*crr4-2 pgr5*）の生育は著しく悪い。

明反応は完結しないのである。

二重変異体の解析から、二つの光化学系 I サイクリック電子伝達は、一部機能を重複していることが明らかになった。しかし、二つの電子伝達は、貢献度や電子供与体など大きな違いが見られる。大事な問題は、二つの経路はどう使い分けられているかである。変異株の表現型から考えて、恒常的に ATP 合成に寄与しているのは PGR5 依存経路である。この経路がないと、植物は強光に対し正常に反応できないし、二酸化炭素固定のための ATP を供給しきれない。一方、NDH 複合体の側から考えると、*crr* 変異体の最も劇的な表現型が現れたのは *pgr5* の変異体バックグラウンド（つまり二重変異体）である。*pgr5* では光化学系 I サイクリック電子伝達の主経路が止まっているので、ATP 不足が起きている。深刻なのはそれに伴い NADPH が余り、ストロマに異常な還元力が蓄積することである。NADPH と ATP は代謝によるブレはあるものの、一定の割合で消費される。NDH 複合体は、この危機を回避するのに働いている。野生型ではもちろん PGR5 依存経路が働いてい

るが、強いストレス下では PGR5 依存経路があってもこの危機は襲ってくる。PGR5 依存経路が恒常的に機能するのに対し、NDH 依存経路はストレス下での安全弁として働くと考えられる。

文 献

- 1) Munekage Y. et al. (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 361-371.
- 2) Hashimoto M. et al. (2003) A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 36: 541-549.
- 3) Munekage Y. et al. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429: 579-582.

◀国内情報▶

植物の自己防衛システムを制御する液胞
プロセシング酵素の発見と機能解明¹京都大学大学院理学研究科, ²自然科学研究機構 基礎生物学研究所³独立行政法人 農業生物資源研究所初谷紀幸^{1, 2}・黒柳美和^{1, 2}・山田健志²・飯 哲夫³・西村幹夫²・西村いくこ¹

植物は病原体の感染に対する生体防御機構として過敏感細胞死を誘導する。過敏感細胞死は、病原体の感染を受けた細胞が自らを犠牲にして、病原体を巻き込みながら心中するというものである。我々は、ウイルスの感染で誘導されるタバコの過敏感細胞死を解析し、細胞内の液胞に局在する液胞プロセシング酵素が過敏感細胞死を制御する重要な鍵酵素であることを証明した。この結果は、病害抵抗性作物の分子育種への応用に道を開くものと期待される。

1. はじめに

植物も私達と同じように常に病原体の攻撃にさらされながら生きている。しかし、植物は本来、大多数の病原体に対して抵抗性を示し、ほんの一握りの病原体によってのみ病気にかかる。植物は動物に見られるような免疫システムを駆使した生体防御機構はもっていないが、それとは異なる植物独自の仕組みで病原体の攻撃から身を守っている。植物の典型的な防御機構として、感染組織における過敏感細胞死があげられる。感染を受けた細胞は急速に過敏感細胞死を起こすことで、病原体を封じ込め、抗菌性物質を蓄積して病原体の感染に抵抗する。

過敏感細胞死は、偶発的な死ではなく、細胞自らの遺伝子発現によって自己を消去するシステム、すなわち植物自身に予めプログラムされた細胞死である。動物のプログラム細胞死としてはオタマジャクシがカエルになるときに尻尾が消えてなくなる現象がよく知られている。このような細胞死を実行する酵素として動物では1990年代前半にカスパーゼと呼ばれるプロテア

HATSUGAI Noriyuki^{1,2}, KUROYANAGI Miwa^{1,2},YAMADA Kenji², MESHU Tetsuo³,NISHIMURA Mikio², NISHIMURA Ikuko¹¹〒606-8502 京都市左京区北白川追分町²〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中38³〒305-8602 つくば市観音台2-1-2

ーゼが発見された。それ以来、植物のプログラム細胞死にも類似したプロテアーゼが関与していると信じられ、国内外で競って「植物版カスパーゼ」の探索が続けられてきた。実際に、過敏感細胞死の過程に動物のカスパーゼに類似した活性をもつプロテアーゼが関与することを示唆する結果が報告されている¹⁾。それは、①細胞死の過程でカスパーゼ活性が上昇する、②カスパーゼ阻害剤が細胞死を抑制する、などである。しかし、植物から動物のカスパーゼに相当する遺伝子の単離は報告されておらず、活性の実体は不明であった。さらに、イネやシロイヌナズナの全ゲノムの配列が解明されると、植物には動物のカスパーゼに類似した酵素は存在しないことがわかり、細胞死を実行する酵素の同定は行き詰まっていた。そのような状況の中、我々はタバコモザイクウイルス (tobacco mosaic virus, TMV) の感染によって誘導されるタバコの過敏感細胞死を解析し、植物細胞内の液胞に局在する液胞プロセシング酵素 (vacuolar processing enzyme, VPE) がカスパーゼと同じ酵素活性をもつことを突き止め、過敏感細胞死を制御する重要な鍵酵素であることを明らかにした²⁾。本稿では、VPEについて、その発見の経緯、および過敏感細胞死におけるVPEの役割について紹介する。

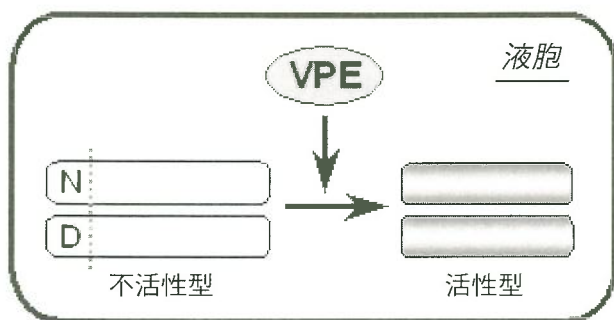


図1 VPEの機能

VPEは液胞に輸送された不活性な前駆体タンパク質を活性型の成熟タンパク質に変換する。標的タンパク質のアスパラギン(N)またはアスパラギン酸(D)残基のC末端側を切断する特徴をもつ⁴⁾。

2. 過敏感細胞死を制御するプロテアーゼの同定

我々は、まず始めにTMVの感染によって誘導されるタバコの過敏感細胞死にもカスパーゼ1活性をもつプロテアーゼが関与するか否かを調べた。タバコの葉にTMVを接種し、過敏感細胞死を誘導できる条件にすると、24時間以内に過敏感細胞死が起こり、感染細胞は死に至る。しかし誘導前にカスパーゼ1の阻害剤を感染葉に浸潤すると、過敏感細胞死が抑えられることを見出した。このことは、TMVの感染に伴う過敏感細胞死がカスパーゼ1活性をもつプロテアーゼによって制御されることを示唆する。

そこで我々は、過敏感細胞死に関わるカスパーゼ1活性をもつプロテアーゼをタバコから同定することを試みた。上述したカスパーゼ1阻害剤で過敏感細胞死が抑えられた結果は、植物細胞内で「カスパーゼ1阻害剤」と「カスパーゼ1活性をもつプロテアーゼ」が結合し、複合体を形成していることを示唆する。そこで、カスパーゼ1阻害剤をビオチンで標識することにより、細胞内で形成される「酵素・阻害剤複合体」をアビジンで検出する方法を開発した。この方法により、細胞内で阻害剤と結合するカスパーゼ1活性をもつプロテアーゼを検出するこ

とに成功した。その後の免疫学的手法により、このプロテアーゼがVPEであることを突き止めた。そこで、VPEの阻害剤をTMV感染葉に浸潤したところ、期待した通りカスパーゼ1の阻害剤と同じように過敏感細胞死が抑えられた。

VPEは液胞に局在し、液胞へ輸送された不活性な前駆体タンパク質を活性型の成熟タンパク質に変換するプロテアーゼである³⁾(図1)。標的タンパク質の分子表面にあるアスパラギン残基およびアスパラギン酸残基のC末端側を特異的に切断する特徴をもっている。

3. 過敏感細胞死におけるVPEの役割

ある遺伝子の機能を解析する場合、その遺伝子の発現を人為的に抑制(サイレンシング)した植物体を用いることが多い。我々は、過敏感細胞死におけるVPEの機能について調べるために、VPE遺伝子をサイレンシングした植物体を作製した。作製した植物体におけるVPEの活性とカスパーゼ1の活性について調べたところ、その両方の活性が共に低下していた。この結果は、植物におけるカスパーゼ1活性の実体がVPEであることを示している。

図2に示すように、ウイルスの感染を受けた細胞はウイルスを封じ込めるために過敏感細胞死を起こし、急速に死んでいく。これに対し、

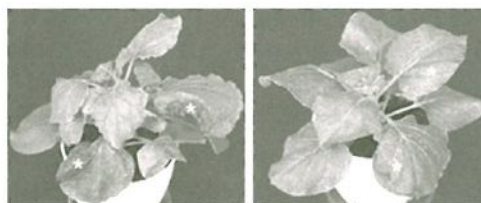


図2 VPE遺伝子をサイレンシングした植物における過敏感細胞死の抑制

アスタリスク(*)の部分にTMVを接種し、過敏感細胞死を誘導後24時間目の写真。非サイレンシング植物(左)では病斑が形成されているが、VPE遺伝子をサイレンシングした葉(右)では病斑の形成が抑えられている。文献2)より改変

VPE遺伝子をサイレンシングした植物では、ウイルスを感染させても過敏細胞死は起こらず、ウイルスが葉の組織内に蔓延していた。これは液胞内のプロテアーゼであるVPEが過敏細胞死に代表される植物のプログラム細胞死において重要な役割を担っていることを端的に示している。

次に我々は、過敏細胞死におけるVPEの役割について検討した。TMVに感染した葉の細胞を電子顕微鏡で観察したところ、葉に病斑が現れる前に液胞膜が部分的に破壊されることを見つけた。ところが、VPE遺伝子をサイレンシングした植物体の葉では、液胞膜の破壊は全く起こっていなかった。さらに液胞膜の破壊と細胞死の関係について詳細に調べるために、BCECF-AMという蛍光色素で液胞を染色した感染葉からプロトプラストを調製し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、過敏細胞死を誘導する前のプロトプラストでは、BCECFの蛍光は液胞に局在しているが、誘導後はその蛍光が液胞から細胞質に漏れ出ることが分かった。一般に死んだ細胞はトリパンブルーで染色されるが、BCECFの液胞外への漏出は細胞がトリパンブルーで染色される前に起きていた。このことは細胞が死ぬ前に液胞膜の破壊が起こることを示している。一方、VPE遺伝子をサイレンシングした植物では、BCECFの蛍光は液胞に局在したままであり、細胞はトリパンブルーによって染まらなかった。この結果からVPEは細胞死の過程で液胞膜の破壊を引き起こし、これによって細胞死が進むのではないかと考えられた。

4. 植物と動物とでは細胞の死に方が大きく異なる

面白いことに、植物のVPEと動物のカスパーゼは同じ酵素活性をもち、共にプログラム細胞死の実行部隊でありながら、細胞内で働く場所がお互いに大きく異なっている。高等生物の細胞は、細胞小器官とそれらを包む細胞質ゾルから成っている。動物のカスパーゼが細胞質ゾルで働く酵素であるのに対し、植物のVPEは細胞小器官の一つである液胞で働く酵素である。

動物では、死にゆく細胞はマクロファージなどの貪食細胞が除去する。しかし、貪食細胞をもたず、堅い細胞壁に囲まれた植物の細胞は自力で自らを消化しなければならない。そのために植物の細胞が死に向かうときには、多様な分解酵素を含む液胞を破壊することにより、自らを分解するという戦術を獲得したと考えられる(図3)。我々は、この液胞を破壊させるステップでVPEが働いているのではないかと考えている。今後、過敏細胞死のみならず、老化や発生過程の細胞死など様々なタイプの植物細胞死の研究に新たな視点を与えるものと期待される。

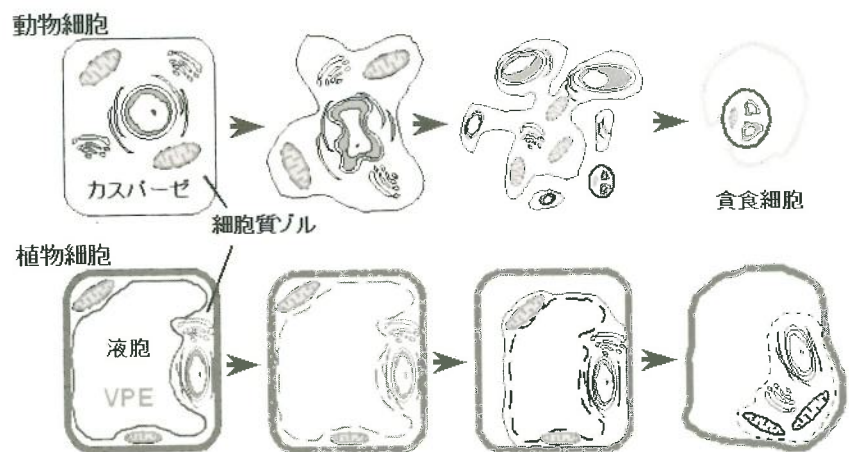


図3 動物と植物における細胞死メカニズムの比較

動物細胞では細胞質ゾルに局在するカスパーゼが中心となって細胞死が起こり、死んだ細胞は貪食細胞によって除去される。それに対し、植物細胞はVPEを介して液胞を破壊することで、自らを分解し細胞は死に至る。

5. 病害防除におけるVPE遺伝子の利用

今回、明らかとなったVPEを中心とする過敏感細胞死メカニズムの解析がさらに進展すれば、病害抵抗性作物の分子育種に応用の可能性が期待できる。世界の食糧作物の病害による損失は年間約15%（約8億人の食糧に相当）とされている。病害による食糧損失の軽減は、21世紀の食糧危機を救う重要課題となっている。そのため、薬剤防除技術に頼らない環境に調和した新たな植物病害防除技術の開発が求められている。VPEを感染細胞特異的に効率よく発現させることができれば、植物自身の防御応答

機構を利用して、病原体の種類に関係なく感染を未然に防ぐことができると考えられる。

文 献

- 1) Lam, E. et al. (2000), *Plant Mol. Biol.*, 44, 417-428
- 2) Hatsugai, N. et al. (2004), *Science*, 305, 855-858
- 3) Hara-Nishimura, I. et al. (1993), *Plant Cell*, 5, 1651-1659
- 4) Hiraiwa, N. et al. *FEBS Lett.*, (1999), 447, 213-216



ブレインテクノニュース

バックナンバーのご案内

第105号

2004年9月15日発行

特 集 「植物における色の遺伝子」

- 1 ブドウの果皮色変異とレトロトランスポゾン…小林 省藏
- 2 遺伝子組換えによるキクの花色改変に向けて…間 竜太郎
- 3 青いバラの創生……………勝元 幸久・田中 良和

国内情報

—土の健康診断— 土壌診断用バイオセンサーの開発
……………橋本 好弘・軽部 征夫
抗IL-10抗体を用いたヨーネ病の早期診断法の開発

……………百溪 英一・森 康行
藍色細菌の時計タンパク質KaiAの原子構造と時計機能
……………宇津巻 竜也・石浦 正寛
アマモ科の遺伝的多様性と日本の沿岸環境……………相生 啓子
セルトレイ苗挿し木装置……………太田 智彦・林 茂彦
地域の先端研究

少ない窒素肥料で生育可能な作物の創出方法……………柳澤 修一

文献情報

ウシ精子へのコレステロール感作が、受精能獲得、先体反応
および受精率に及ぼす影響……………(抄訳：下司 雅也)
海水に適応したアトランティックサーモンの反復遊泳能力へ
及ぼす飼料中の脂肪酸組成の影響……………(抄訳：塩谷 格)
植物に酒豪遺伝子?……………(抄訳：岩井 純夫)
光合成による水の酸化反応中間体の検出……………(抄訳：吉川 彰)

生研センターからのご案内

◀国内情報▶

ニジマスを生むヤマメの作出：
魚類始原生殖細胞を用いた発生工学

¹東京海洋大学 海洋科学部, ²科学技術振興機構 さきがけ研究21
吉崎悟朗^{1, 2}・竹内 裕¹・小林輝正¹・高柴邦子¹・奥津智之¹・竹内俊郎¹

著者らは近年、卵から孵化したばかりの仔稚魚が保持する始原生殖細胞を、GFP蛍光を指標にして単離する技術を開発した。さらに、得られた始原生殖細胞を異種個体の腹腔内に移植すると、ドナー細胞は宿主の生殖腺に移動し、取り込まれた後、機能的な配偶子にまで分化できることを明らかにした。本研究は魚類遺伝子資源の保全や栽培漁業の簡略化に貢献するものと期待される。

1. はじめに

近年、地球規模での環境破壊や乱獲により、天然の魚類資源が急激に減少している。これらの魚を絶滅の危機から救うため、あるいはこれら魚類の資源量減少を食い止めるため、我々は魚類の始原生殖細胞を用いた様々な発生工学技法の開発を試みてきた。始原生殖細胞とは、孵化前後の仔稚魚が保有する性的に未分化な生殖細胞であり、雌個体内では卵へ、雄個体内では精子へと分化することが運命付けられている。卵と精子は受精を介して個体を作り出すため、この始原生殖細胞は成熟・受精という過程を経て、個体へと改変可能な細胞であるといえよう。本稿ではこの始原生殖細胞を用いた様々な発生工学技法について紹介したい。

2. 魚類遺伝子資源の保全

哺乳動物では精子の凍結保存に加え、卵や初期胚の凍結保存も可能になっている。一方、魚類では、卵が極めて大型であるうえ（サケ・マス類の卵は直径5 - 6 mmにも達する）、脂肪分を多く含むため、その凍結保存技術は未だ確立されていない。したがって、絶滅が危惧され

YOSHIZAKI Goro, TAKEUCHI Yutaka,
KOBAYASHI Terumasa, TAKASHIBA Kuniko,
OKUTSU Tomoyuki, TAKEUCHI Toshio.
〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

ている魚種、あるいは地域集団の遺伝子資源を保全するためには、個体を継代飼育する以外に方法が無いのが現状である。そこで、直径が20 μ m程度と小さな始原生殖細胞を仔稚魚から取り出して凍結保存した後、移植操作を介して、宿主生殖腺内で凍結細胞由来の卵や精子を生産できれば、この始原生殖細胞の凍結保存は卵と精子両者の凍結保存に匹敵する意義を持つと考えた。

一方、絶滅の危機に瀕している種以外でも、乱獲によりその資源量の減少が危惧されている魚種も少なくない。現在、これら資源の保全には栽培漁業と呼ばれる方法が用いられている。すなわち、親魚から得られた配偶子を受精させた後、ある程度の大きさまで育成した種苗を自然の海に放流することで、天然資源を補充する方法である。この方法の問題は親魚がマグロのように巨大な場合（体重が数百キロに達する）やチョウザメのようにその成熟に長期間を必要とする場合（10年以上）、受精卵を得るための親魚の養成に莫大なコストや労力、さらには特殊な施設が必要になる点である。そこで、当該魚種の始原生殖細胞を取り出し、近縁で成熟が早く飼育しやすい宿主へ移植することで、放流用種苗の生産が簡便化できると考えた。

以上のような最終目標を掲げ、我々の研究室ではニジマスをモデルに用いて生きた始原生殖細胞を可視化し、単離する技術の開発を第一に試みた。

3. 魚類始原生殖細胞の単離

孵化前後の小さな仔稚魚から生きた始原生殖細胞を単離するためには、これらの細胞を何らかの方法で他の細胞から区別する必要がある。魚類の始原生殖細胞は高等動物のように、その細胞表面を認識する特異抗体の存在が知られていなかったため、我々は緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を用いた細胞の標識を考えた。そこで、始原生殖細胞で特異的に活性化される*vasa*遺伝子の発現制御領域にGFP遺伝子を接続したコンストラクトをニジマスに導入することで、始原生殖細胞が特異的に可視化された遺伝子導入ニジマス系統を作出した^{1) 2)}。続いて、これら始原生殖細胞が発する緑色蛍光を指標に、フローサイトメーターを用いて生きた始原生殖細胞のみを大量に精製する技術を開発した³⁾。今回は紙面の都合で詳細は割愛するが、我々の研究室では既にニジマス始原生殖細胞の凍結保存技術も確立しており、エチレングリコールを含む凍結保護剤を用いることで、解凍後も高い生残率を得ることに成功している⁴⁾。

4. 始原生殖細胞の異種間移植

さて、始原生殖細胞を単離・凍結していた種が絶滅してしまった場合、あるいは種苗生産が困難な種の受精卵を飼育が容易な魚種に生産させる場合、これらの始原生殖細胞を異種の宿主に移植する必要がある。そこで、次にGFP標識されたニジマス始原生殖細胞を異種の子供メ宿主に移植する技術の開発を試みた。この場合、最初に問題となるのは移植細胞が異種宿主によって免疫的に拒絶される

点である。そこで、我々は免疫系が極めて未熟であることが知られている孵化直後の稚魚を宿主として用いた。しかし、孵化稚魚の生殖腺は極めて小さく始原生殖細胞を直接移植することは到底不可能である。そこで、胚形成時に「始原生殖細胞が生殖腺外で分化し、その後生殖腺に向かって移動する」という原理を利用した⁵⁾。すなわち、生殖腺内に始原生殖細胞を直接移植しなくても、その周辺に細胞を移植すれば、移植細胞が生殖腺に向かって自発的に移動すると考えたのである。実際に、ニジマスの孵化稚魚から単離した始原生殖細胞10から20細胞をヤマメ孵化稚魚の腹腔内にマイクロインジェクターを用いて移植した(図1)。すると予想どおり、GFPで標識されたニジマス始原生殖細胞は、仮足を使ってヤマメ腹腔内を生殖腺に向かって移動し、最終的にはヤマメの生殖腺内に取り込まれることを確認した。

さらに、移植後1年目にニジマス始原生殖細胞を移植したヤマメ宿主が成熟したため、これらの魚から精液を採取し、PCR解析に供した。宿主に用いたヤマメは遺伝子組換えを施してい

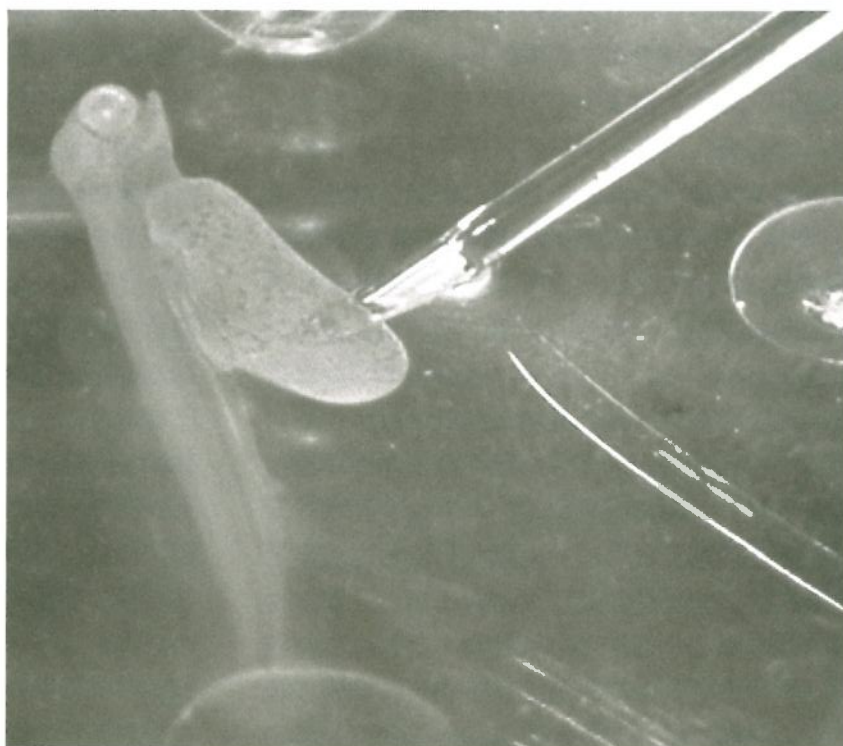


図1 始原生殖細胞の孵化稚魚腹腔内への移植

ない野生型であるので、ドナー由来のニジマス精子のみが特異的にGFP遺伝子を保持していることが予想される。そこで、GFP遺伝子に対する特異プライマーを用いたPCR解析により、宿主ヤマメ精液中におけるドナーニジマス由来精子の検出を試みた。その結果、37尾の宿主ヤマメから得られた精液のうち、5尾の精液より抽出したDNAを鋳型に用いた場合、GFP遺伝子の増幅が認められた。このことは、これらの5尾のヤマメ宿主か

ら得られた精液中にドナー由来のニジマス精子が含まれていることを示唆している。次に、これらの精液を通常のニジマス卵に媒精した。この場合、ヤマメ宿主由来の精液は宿主自身がもともと保持していたヤマメの精子とドナー由来のニジマス精子の両者を含むと予想される。もし、ヤマメの精子がニジマス卵に受精した場合、ニジヤマ雑種が生じるが、ニジマス精子がニジマス卵に受精した場合、当然、通常のニジマスが生まれてくるはずである。通常のニジマスは水温10℃で飼育すると受精後34日にはすべての個体が孵化するが、ヤマメはすべての個体が孵化するまでに45日を要する。ニジマス卵とヤマメ精子が受精したニジヤマ雑種はそのちょうど中間の41日で孵化が終了する。一方、上記ヤマメ宿主5尾のうち1尾の個体から得られた精液を用いて作出した次世代では、多くの卵が孵化までに41日近く要したのにも関わらず、10粒の卵が受精後34日、すなわち通常のニジマスと完

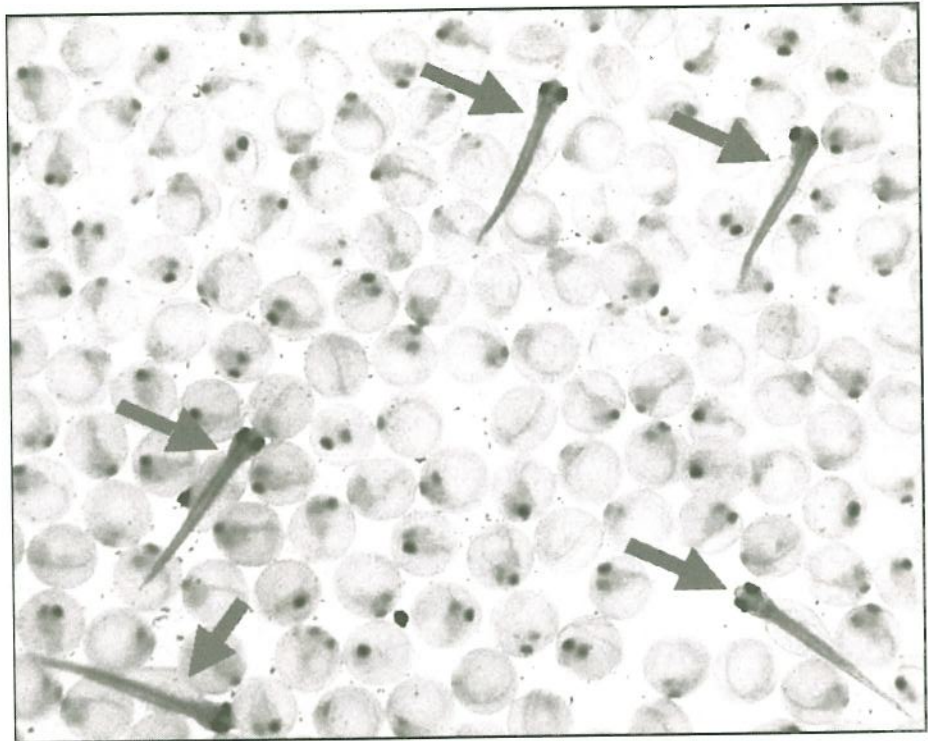


図2 ニジマス始原生殖細胞を移植されたヤマメ宿主から得られた精液をニジマス卵に媒精することで得られた次世代
矢印は、受精後34日で孵化したニジマス稚魚。他の卵はニジマスとヤマメの雑種になっているため孵化が遅れている。

全に同じ時期に孵化したのである（図2）。

我々は得られた10個体が、ドナーであるGFP遺伝子導入ニジマス由来の精子から生じたと考え、これらの個体の生殖腺を蛍光観察したところ、始原生殖細胞が緑色蛍光を発していることが確認された。さらに、受精後34日で孵化した稚魚から抽出したDNAを用いて親子鑑定を行った。Random Amplified Polymorphic DNA解析を行ったところ、これらのサンプルは通常のニジマスと同一のバンドパターンを示しており、ヤマメ宿主より得られたこれら10個体がDNAレベルでも完全なニジマスであることが確認された。一方、同じ宿主から得られた精液由来でも、孵化に41日近くを必要とした個体のサンプルでは、そのすべてにおいてヤマメ由来のバンドとニジマス由来のバンドの両者が認められた。このことから、これらの個体は雑種であることが明らかとなった。ヤマメ宿主より得られたニジマスはその後も順調に成長して

おり、外部形態も間違いなく通常のニジマスと同一であった（図3）⁶⁾。従来、精原細胞を免疫不全マウスの精細管に移植することで異種に由来する精子を得たという報告はあったが⁷⁾、生殖細胞移植により異種に由来する完全な次世代個体が作出されたという報告は今回の例が初めてである。現在までに、ヤマメ宿主個体で生産されたニジマス卵に由来する完全なニジマス個体を得ることに成功している（奥津ら、未発表）。



図3 ヤマメ宿主から生まれたニジマス
受精後5ヶ月であるため体側のパーマークは残っているが、
外観上は全く通常のニジマスと同様である。

5. ニジマスしか生まないヤマメの作出を目指して

ここまでに紹介した方法は、ニジマスとヤマメの両配偶子を生産するヤマメ宿主の作出である。当然、本技法を応用していくにあたり、ニジマスの配偶子しか生産しないヤマメ宿主の生産が望まれる。我々は現在、このようなヤマメの作出を目指し、自身の生殖細胞を形成しない宿主魚の作製を試みている。最近、*dead end*と呼ばれるRNA結合タンパク質をコードした遺伝子がゼブラフィッシュから単離され、この遺伝子産物がゼブラフィッシュの生殖細胞の維持に必須の分子であることが報告された⁸⁾。そこで、我々もニジマスの*dead end*遺伝子を単離し、この遺伝子の翻訳をアンチセンス法で阻害することでニジマスの生殖細胞を除去することを計画した。ニジマスでは化学修飾されたオリゴヌクレオチドの1種であるモルフォリノオリゴヌクレオチド（以下MO）を用いたアンチセンス法が翻訳阻害に有効であることを以前報告している⁹⁾。そこで、始原生殖細胞がGFPで標識された遺伝子導入ニジマスの受精卵に、*dead end*遺伝子に対するアンチセンスMOをマ

イクロインジェクションすることで、*dead end*遺伝子の翻訳阻害が始原生殖細胞に与える影響を解析した。その結果、本アンチセンスを注入した胚は全く正常に発生するにも関わらず、緑色蛍光を発する始原生殖細胞が完全に消失していることを明らかにした。なお、これらの個体を組織学的に観察し、間違いなく始原生殖細胞が消失していることも確認済みである（高柴ら、未発表）。今後は、これらの個体にドナー由来の始原生殖細胞を移植した場合も、宿主生殖腺内で正常にドナー由来の配偶子を生産可能であるかを検討していく必要がある。また、魚類の場合、非常に簡便な方法で不妊の3倍体を作成することが可能であるため、これらの魚を宿主に用いることも現在、検討中である。

6. おわりに

始原生殖細胞の凍結保存により、魚類の遺伝子資源、特にミトコンドリアDNAのように母性遺伝する因子をも完全に保全する技術を初めて確立した。しかし、本技法はあくまでも最終手段であることは言うまでもない。第一にすべきことは絶滅しそうな魚たちが生息する環境を修復・保全し、乱獲や汚染を未然に防ぐことである。しかし残念なことに、このような生息環

境の修復・保全では間に合わずに、希少な魚種や地域集団が絶滅していってしまうことが危惧される。ここで紹介した始原生殖細胞を用いた方法は、このような場合のバックアップ手段としてこそ、その威力を発揮するものと期待される。したがって、本法を様々な魚種に応用できるよう、技術開発を進めることが今後の重要な課題であろう。最後になるが、本稿ではGFP遺伝子を組み込んだニジマスを用いた研究例のみを紹介したが、遺伝子組換え技法を用いずに始原生殖細胞を可視化する方法も既に開発済みであり（多湖ら、投稿中）、自然の海や河川に放流する魚を生産する場合には、こちらの方法を利用すべきであることを付け加えたい。

文 献

- 1) Yoshizaki, G. et al. (2000): *International Journal of Developmental Biology*, 44: 323-326.
- 2) Takeuchi Y, et al. (2002): *Biology of Reproduction*, 67: 1087-1092.
- 3) Kobayashi, T. et al. (2004): *Molecular Reproduction and Development*, 67: 91-100.
- 4) Kobayashi, T. et al. (2003): *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 479-480.
- 5) Takeuchi, Y. et al. (2003): *Biology of Reproduction*, 69: 1142-1149.
- 6) Takeuchi, Y. et al. (2004): *Nature*, 430: 629-630.
- 7) Clouthier DE. et al. (1996): *Nature*, 381: 418-421.
- 8) Weidinger, G. et al. (2003): *Current Biology*, 13: 1429-1434.
- 9) Boonanuntanasarn, S. et al. (2002): *Marine Biotechnology*, 4: 256-266.

◀国内情報▶

サツマイモ茎からの内生窒素固定細菌の 分離・同定と茎中生息の確認

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
九州沖縄農業研究センター畑作研究部

安達克樹・Constancio A. Asis, Jr.

サツマイモの茎に生息している内生窒素固定細菌 *Klebsiella oxytoca* と *Pantoea agglomerans* を分離・同定した。サツマイモの茎の中からは、非窒素固定性の内生細菌 *Enterobacter asburiae* も分離された。茎切片培養—アセチレン還元活性法 (SPI-ARA法) により、サツマイモの茎の中に内生窒素固定細菌が生息していることを確認した。内生窒素固定細菌はサツマイモの茎の中に不連続に生息していることが示唆された。

1. はじめに

サツマイモは従来より窒素施肥量の少ない作物として知られており、九州・沖縄・関東他の地域の畑作地帯において基幹作物の一つとして栽培されている。近年、重窒素 (^{15}N) 自然存在比の測定によりサツマイモにおける空中窒素固定が示唆されており^{14, 15)}、その窒素固定能の評価が進められている^{10, 11)}。そこで、九州沖縄農業研究センター畑作研究部の内生窒素固定細菌研究グループでは、サツマイモの茎の中に生息する窒素固定細菌の分離と同定を進めた。

2. サツマイモ内生窒素固定細菌を分離し、同定する

安達ら¹⁾は、半流動無窒素培地を用いて、表面殺菌したサツマイモ (品種: ベニオトメ) の茎から内生窒素固定細菌 *Klebsiella oxytoca* BO-1 株を分離した。このことは国内で初めてのサツマイモの内生窒素固定細菌の分離例となった。Asis・安達⁴⁾は、半流動改変レニー培地を用いてコガネセンガンの茎から別の内生窒素固定細菌 *Pantoea agglomerans* MY 1 株を分離した。図 1 に、これら 2 株 *K. oxytoca* BO-1 株 (A) と *P. agglomerans* MY 1 株 (B) の顕微鏡写真を示す。以後、私達のグループは、都城・ADACHI Katsuki, Constancio Aguipto Asis, Jr.
〒885-0091 宮崎県都城市横市町6651-2

種子島・沖縄本島・石垣島・つくばの異なる五つの地域よりサツマイモの内生細菌を探索・収集した。これらの地域から *Klebsiella* spp. と *P. agglomerans* が分離された。

3. 内生細菌を共存培養すると窒素固定活性が向上する

サツマイモの茎から得られる内生細菌の中には、非窒素固定性の細菌も分離されていた。この中のコガネセンガンより分離した MY 2 株は *Enterobacter asburiae* と同定された⁴⁾。図 1 に *E. asburiae* MY 2 株の顕微鏡写真 (C) を示す。窒素固定性および非窒素固定性の内生細菌はサツマイモの同じ生息位置 (niches) に住んでいるため、両者はある種の密接な関係を持っているかもしれない。そこで私達は、窒素固定性 *P. agglomerans* と非窒素固定性 *E. asburiae* を試験管内で一緒に培養 (共存培養) する試験を行った³⁾。図 2 は、*P. agglomerans* のみ (単独培養) と、*P. agglomerans* + *E. asburiae* (共存培養) をした時の培養液の窒素固定活性を示す。両者を共存培養すると、*P. agglomerans* を単独培養するよりも窒素固定活性が約 2 倍に向上した。このことは、サツマイモ茎中において内生細菌同士が何らかの相互作用を及ぼしあっていることを示唆している。

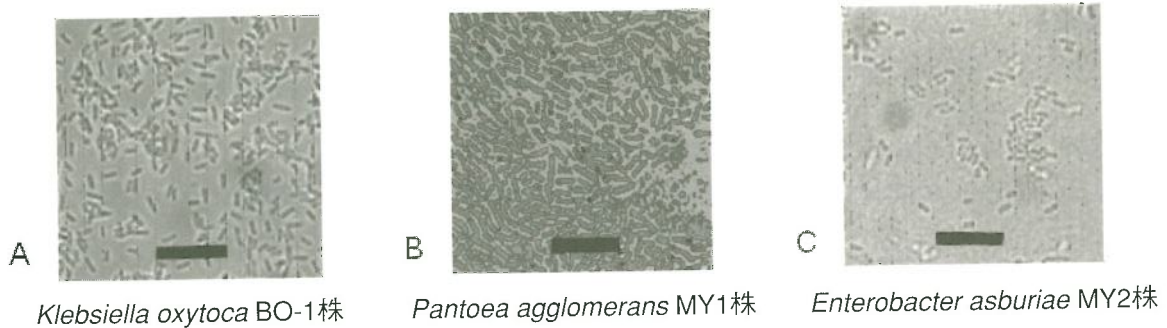


図1 内生窒素固定細菌 *Klebsiella oxytoca* BO-1 株 (A), *Pantoea agglomerans* MY 1 株 (B) と非窒素固定性内生細菌 *Enterobacter asburiae* MY 2 株 (C).

注: バーの長さは10 μmを示す。(Adachi et al.¹⁾, Asis and Adachi⁴⁾ より)

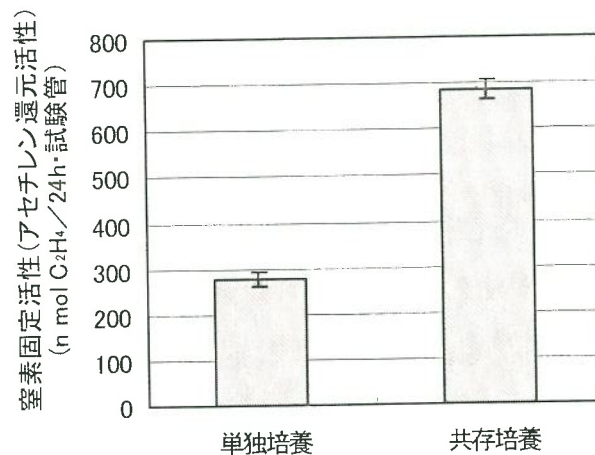


図2 内生窒素固定細菌 *Pantoea agglomerans* と非窒素固定性内生細菌 *Enterobacter asburiae* の共存培養による窒素固定活性の向上効果.

注: 半流動改変レニー培地に *Pantoea agglomerans* のみ (単独培養), *Pantoea agglomerans* + *Enterobacter asburiae* (共存培養) をそれぞれ一定菌量接種して36時間培養後, 窒素固定活性 (アセチレン還元活性) を調べた。(安達・Asis³⁾ より)

4. サツマイモの茎のどの部位に内生窒素固定細菌が生息しているのか?

サツマイモの茎の中に内生窒素固定細菌が生息していることは, 表面殺菌 (70%エタノール1分間 + 2%次亜塩素酸ナトリウム5分間処理後, 滅菌水中で洗浄) した節間から切り取った切片 (厚さ1~2mm) を窒素固定細菌の生育に適した培地 (半流動改変レニー培地) で5日間程度培養し, 内生細菌の生育を待ってからアセチレン還元活性を測定する方法により確認できる (茎切片培養—アセチレン還元活性法,

SPI-ARA法)²⁾。2002年7月下旬 (挿苗2ヵ月後) と9月中旬 (挿苗4ヵ月後) にサツマイモ3品種 (シロユタカ・コガネセンガン・シロサツマ) について2連で茎を採取し, SPI-ARA法に供試した。生息部位の解明のため, 図3に示すように, 採取したサツマイモ茎の異なる五つの部位から節間を採取し, 表面殺菌処理後, 各節間の中央付近より五つの隣り合った切片を取り, 各切片についてSPI-ARA法を行った。培養5日目に試験管培養液のアセチレン還元活性 (ARA, 窒素固定活性) を測定すると, ARA陽性試験管が検出され, サツマイモの茎

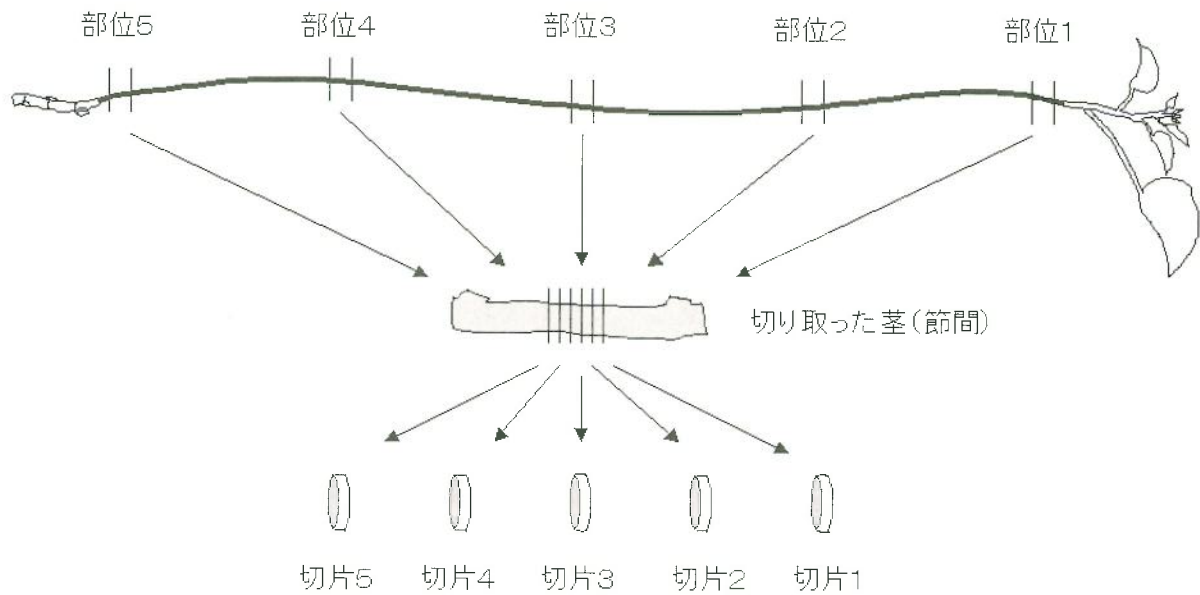


図3 サツマイモの茎からの部位・切片のサンプリング。(Adachi et al.²⁾ より)

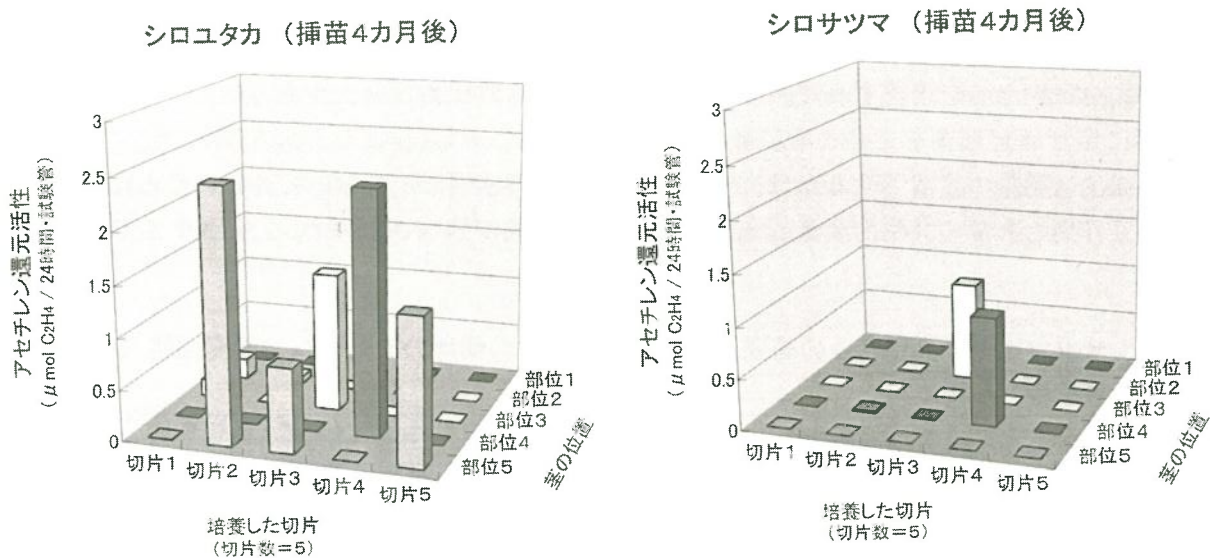


図4 挿苗4ヵ月後に採取した茎サンプルの異なる五つの部位から得られた隣接する五つの切片を培養した時のアセチレン還元活性(窒素固定活性)。シロユタカとシロサツマの2反復(茎2本)の内の各茎1本分のデータを示す。(Adachi et al.²⁾ より)

の中に内生窒素固定細菌が生息していることが確認できた。図4は、挿苗4ヵ月後に採取したシロユタカとシロサツマの茎の異なる五つの部位から得た各々五つの切片のARA活性を示す。同一の部位から得られた隣接する五つの切片において、ARA陽性切片とARA陰性切片の両方

が検出された。表1に、サツマイモ3品種の各節間から得られた五つの切片のARA値を平均した値を示す。少なくとも一つの切片がARA陽性である部位をARA陽性部位とすると、ARA陽性部位の頻度および全ての切片・部位・品種のARA活性の平均値は、挿苗2ヵ月

後よりも挿苗4ヵ月後において高くなった。先端近くの部位(部位1)ではARA陰性であり、地際近くの部位(部位4と部位5)ではARA値が高くなる傾向が見られたが、総じて各品種の茎反復間でARA陽性部位の位置は不安定であった。こうしたSPI-ARA法の結果から、半流動改変レニー培地で培養可能な内生窒素固定細菌は、サツマイモの茎の中に不連続に生息していること(discrete localization)が示唆された。挿苗2ヵ月後よりも挿苗4ヵ月後においてARA陽性部位の頻度とARA活性の平均値が高いことは、茎の中の内生微生物の構成や活性がサツマイモの生育初期から後期へと徐々に変化しているであろうことを示唆している。

5. おわりに

最近、私達は培養官やマヨネーズ瓶の中で生育させたサツマイモ無菌苗に低窒素条件下で *Pantoea agglomerans* を接種する試験を実施した。作物に窒素固定細菌をどのように接種し、いかに効果的に感染・定着させるかは、作物-微生物相互作用としての共生的窒素固定を利用

する技術開発のために、重要な研究項目である。Paulaら¹²⁾は、サツマイモ、サトウキビ、ソルガムへのアーバスキュラー菌根菌と内生窒素固定細菌 *Gluconacetobacter diazotrophicus* の共接種試験を行った。また、内生窒素固定細菌として分離された *P. agglomerans* は、これまで葉面細菌(phyloplane bacteria)としても認知されており^{5, 8)}、病害防除に利用するための研究も行われている^{6, 7, 13)}。葉面散布による *P. agglomerans* の接種は、内生生息への移行による空中窒素固定、葉面生息による病害抵抗性向上等の可能性を求めて、*P. agglomerans* を利用するための接種試験の選択肢の一つとなるかもしれない。

サツマイモはこのように、茎の中に窒素固定細菌を共生させていて、窒素栄養において特徴のある作物と言える。他方では、サツマイモの根に共生するアーバスキュラー菌根菌(この微生物も内生微生物ととらえることができる)に関する興味ある発表がある⁹⁾。サツマイモの根にはアーバスキュラー菌根菌が共生しており、根内の感染部位において非常に盛んな樹枝状体の形成が観察された⁹⁾。「サツマイモ根-菌根

表1 サツマイモ3品種各々の節間から得られた五つの切片のアセチレン還元活性(ARA)を平均した値。

品 種	反 復	ARAの平均値 ^a (μmol C ₂ H ₄ / 24時間・試験管)					全部位の 平均値
		茎の部位 ^b					
		部位1	部位2	部位3	部位4	部位5	
挿苗2ヵ月後(7/30 - 7/31, 2002)							
シロユタカ	茎1	0	0.699	0.306	0	0	0.201
	茎2	0	0	0.007	0.009	0.005	0.004
コガネセンガン	茎1	0	0	0	0	0	0
	茎2	0	0.009	0	0	0	0.002
シロサツマ	茎1	0	0	0	0	0	0
	茎2	—	—	—	—	—	—
3品種の平均値		0	0.142	0.063	0.002	0.001	0.041
挿苗4ヵ月後(9/18 - 9/20, 2002)							
シロユタカ	茎1	0	0.152	0	0.543	0.846	0.308
	茎2	0	0.055	0.303	0.474	0.937	0.354
コガネセンガン	茎1	0	0.004	0.009	0.004	0	0.003
	茎2	0	0	0	0	0	0
シロサツマ	茎1	0	0.194	0	0.213	0	0.082
	茎2	0	0	0	0.008	0.131	0.028
3品種の平均値		0	0.068	0.052	0.207	0.319	0.129

^a隣接する五つの切片を培養した試験管のアセチレン還元活性(ARA)の平均値。

^b茎の部位は、先端部(茎頂)から地際部の方向へ数えた節間の番号で示す(図3参照)。部位1:採取した茎の先端近くの部位, 部位2:部位1と部位3の中央, 部位3:先端部と地際部の中央, 部位4:部位3と部位5の中央, 部位5:地際近くの部位。

^c分析せず(挿苗2ヵ月後のシロサツマはn=1)。(Adachi et al.²⁾より)

菌」の共生関係により、リン栄養においてもユニークな特徴があるのでは、と考えている。

今後は、こうした作物と微生物の共生による有用な生物機能を活かして、サツマイモや他作物への施肥量の節減へとつなげるため、内生窒素固定細菌の利用技術化を検討している。しかしながら、サツマイモの内生窒素固定細菌の生態学的知見はなお限られている。そのため、将来の利用技術化を見通した基礎的知見（微視的な生息部位、感染形態、植物体内窒素固定活性、活性発現条件、窒素固定量等）の集積を急ぐ必要がある。

文 献

- 1) Adachi, K. et al. (2002), *Soil Sci. Plant Nutr.*, 48, 889-895
- 2) Adachi, K. et al. (2004), *Microb. Environ.*, 19, 40-44
- 3) 安達克樹・Asis, Jr. C.A. (2003), 九州沖縄農業研究成果情報, 18, 583-584
- 4) Asis, Jr. C.A. and Adachi, K. (2004), *Let. Appl. Microbiol.*, 38, 19-23
- 5) Atef, N.M. (2000), *Phytopathol. Mediterr.*, 39, 366-375
- 6) Braun-Kiewnich, A. et al. (2000), *Phytopathol.*, 90, 368-375
- 7) Lindow, S.E. et al. (1998), *Phytopathol.*, 88, 1149-1157
- 8) Marcell, L.M. and Beattie, G.A. (2002), *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 1236-1244
- 9) 増原学ら (1994), *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 60(3), 319
- 10) 大脇良成・藤原伸介 (2002), 農業技術, 57(9), 15-19
- 11) 大脇良成ら (2003), 植物微生物研究会講演要旨集, 第13回, 90
- 12) Paula, M.A. et al. (1991), *Biol. Fertil. Soils*, 11, 111-115
- 13) Ruppel, S. et al. (1992) *Plant Soil*, 145, 261-273
- 14) Yoneyama, T. et al. (1997), *Plant Soil*, 189, 239-244
- 15) Yoneyama, T. et al. (1998), *Boil. Fertil. Soils*, 26, 152-154

◀国内情報▶

高品質なたい肥生産を求めて

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
生物系特定産業技術研究支援センター

原 田 泰 弘 ・ 道 宗 直 昭

家畜ふん尿の有効利用を促進するため、高品質なたい肥を効率的に生産するための装置を開発した。高精度固液分離装置は、乳牛舎等から排出される含水率90%程度のふん尿をたい肥化が容易な含水率75%以下の固形分と液状分とに分離する装置であり、毎時3～5 m³程度処理できた。搾乳牛100頭相当以上の農家や共同利用施設などを対象とした品質管理型たい肥自動混合・かくはん装置、搾乳牛50頭相当程度以下の戸別農家を対象とした自然エネルギー活用型高品質たい肥化装置は、雑草種子、病原菌の死滅した高品質な堆肥を4週間で生産できた。

1. はじめに

平成11年に施行された「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」の適用猶予期間が終了し、本年11月から管理基準が適用されることとなり、基準に適合する処理施設の整備、家畜排せつ物の適正な管理が義務付けられることとなった。この法律は肥料取締法の一部改正法や持続性の高い農業生産方式の導入促進法と併せ、家畜ふん尿を資源として有効に利用することをより一層促進することが目的である。しかし、家畜ふん尿を経営内で利用しきれない農家は非常に多く、また畜産業が集中している地域では、たい肥の利用先を県外に拡大することも行われている。特別栽培米農家が家畜ふんたい肥を使用し始める条件を聞いたアンケート（日本土壤協会、1998）では、雑草種子の混入がなく、安定した高品質なたい肥26%、散布しやすい乾燥品9%、病原菌等がない安全なたい肥2%であり、37%の農家が高品質なたい肥を求めている。家畜排せつ物法に基づき、たい肥化処理施設等が整備されてきたところであるが、耕種農家のニーズに合わないたい肥は行き先を失い、利用されない可能性が高くなることも考えられる。

このような背景を踏まえ、生研センターでは、
HARADA Yasuhiro, DOSHU Naoaki
〒331-8537 さいたま市北区日進町1-40-2

作物や土壌に対して有効かつ安全であり、取扱いやすい高品質なたい肥を生産することを狙いとした高精度固液分離装置、品質管理型たい肥自動混合・かくはん装置、自然エネルギー活用型高品質たい肥化装置の開発を行ってきたので紹介する。

2. たい肥化処理と課題

たい肥化処理は、たい肥材料の通気性を改善するための前処理、主に作物施用時に生育障害の原因となりやすい易分解性有機物を分解する一次処理、残存する生育障害物質と難分解性有機物の一部分解等により安定化を図る二次処理の3ステージに分けることができる。前処理は、オガ屑などを副資材として混合する方法で行われることが多いが、例えば、ふん尿分離されて牛舎から排出された乳牛ふんを2,000円/m³のオガ屑で処理する場合、50頭規模では1日当たり4,500円程度の資材費が必要で、しかもたい肥材料の量は増え、たい肥化処理施設の規模が大きくなる。既にオガ屑を入手しにくい地域もあり、副資材に依らない前処理技術が求められている。一次処理は、高品質たい肥を生産する上で非常に重要な処理である。一次処理では主に易分解性有機物の分解が行われるが、このときのたい肥材料の温度上昇が、雑草の種子、病原菌などを死滅させるとともに水分を蒸発させ、

たい肥を汚濁感のないものに変えていく。たい肥化処理装置は、この一次処理の効率化を図り、たい肥化反応を促進するのが目的であるが、現場において通気量、水分、温度等の諸条件の最適化を図ることは困難とされてきた。現在、かくはん装置を有する様々なたい肥化装置が市販されているが、ユーザーの経験を踏まえた運転管理技術（諸条件の設定）に頼るところが非常に大きく、投資した額に見合うだけの成果が得られていないケースも見られる。高品質なたい肥を効率的に生産するためには「誰がやってもうまくいく」たい肥化処理技術を確立することが必要である。

3. 高精度固液分離装置

1) 装置の基本コンセプト

本装置は、乳牛舎等から排出される含水率90%程度のふん尿をそのままたい肥化が可能な固形分と液状分に分離することが第1のねらいである。そのままたい肥化が可能とは、副資材を混合しなくても通気性が確保される状態であり、少なくとも水分75%程度以下にすることが求められる。副資材が不要となることで、その購入費が要らなくなり、水分調製作業も不要となるほか、副資材を混合して調製する場合と比較してたい肥材料の量が半減する。第2のねらいは、これまで固液分離装置の普及を妨げる原因の一つとされていた小石、釘等の異物による装置の破損を防止することであり、破損を回避できれば故障等によるメンテナンス費を低減することができる。

2) 装置の概要

装置は、スクリープレス型の装置であり、電動機、スクリュー、スクリーン等で構成する（表1、図1、図2）。目標とする分離性能を達成し、固形分のスムーズな排出による処理量の確保を図るため、固形分排出部の抵抗体（押さえ板）をスクリュー軸に組み込んだバネによる圧力調整方式としたほか、スクリーン部をスク

表1 高精度固液分離装置の主要諸元

固液分離方式		スクリープレス式
全長	(mm)	1,800
全幅	(mm)	1,000
全高	(mm)	1,100
質量	(kg)	300
電動機	(kW)	5.5
スクリーン	種類	ウェッジワイヤ式
	目幅 (mm)	1.0
	形状	入口側：平行 排出側：傾斜
スクリュー	直径 (mm)	250
	形状	切り欠き形状
圧力調整方式		バネ式

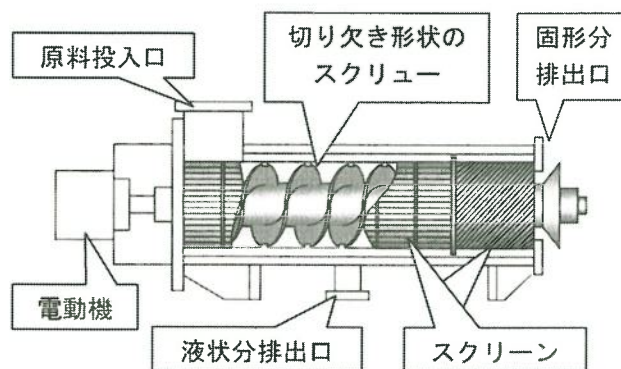


図1 高精度固液分離装置の概要

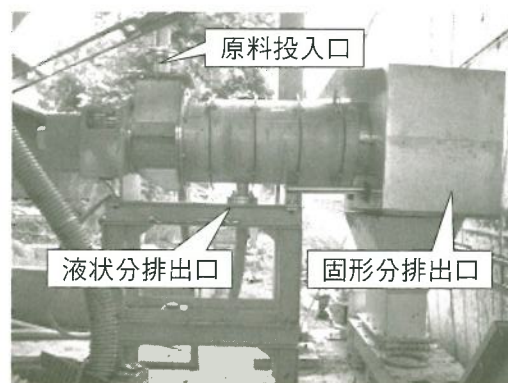


図2 高精度固液分離装置

表2 品質管理型たい肥自動混合・かくはん装置の主要諸元

全長	(mm)	3,200
全幅	(mm)	6,140
全高	(mm)	3,240
質量	(kg)	5,500
走行部	走行速度 (m/分)	0.6
	作業速度 (m/分)	0.3
	走行方式	4輪式(車輪・レール併用)
	動力 (kW/輪)	0.2
かくはん部	方式	ロータリ式
	かくはん径 (mm)	2,000
	軸回転数 (rpm)	30
	動力 (kW)	11
	昇降動力 (kW)	0.75×2台
	支持方式	2点支持

リュー軸に対して目の方向が平行なスクリーンと傾斜したスクリーンの2種類のウェッジワイヤスクリーンを組合せた構造とした。スクリーンは、ふん尿に混入する異物（小石、釘など）によるスクリーンの破損を防止するために外周部に切り欠きを設けた構造とした。

3) 装置の性能

埼玉県のある農家において、乳牛舎から排出される含水率90%程度のふん尿を用いて試験した結果、水分75%以下の固形分と液状分とに分離できた。また、毎時3m³以上（搾乳牛50頭規模以上）の処理能力で安定した連続運転ができた。また、ふん尿中に混入する小石、釘などの異物によるスクリーンの破損が発生しなくなった。

4. 品質管理型たい肥自動混合・かくはん装置

1) 装置の基本コンセプト

本装置は、搾乳牛100頭相当（処理量7.5t/日程度）以上の大規模農家や共同利用たい肥化施設等を対象とし、かくはん作業や通気の自動化により、たい肥化処理の効率化、省力化、運転費の低コスト化を図り、4週間で確実にたい肥化一次処理を終了することを目標として開発した。一次処理において有機物分解率30%程度、たい肥材料温度60℃以上を達成し、耕種農家が求める病原菌や雑草種子の死滅した高品質なたい肥を生産することがねらいである。

2) 装置の概要

本装置は、たい肥化処理の過程でたい肥材料の発酵状況を把握し、その情報に基づいて通気、かくはん作業等を行う装置である。装置は、昇降機構を有するかくはん部、たい肥材料の発酵状況を把握する品質管理制御システム及び走行部で構成し、かくはん作業を自動で行い、通気を制御する機能を有する（表2、図3、図4）。たい肥材料のかくはん作業は装置によって週1回実施するが、必要な処理区について別途作業

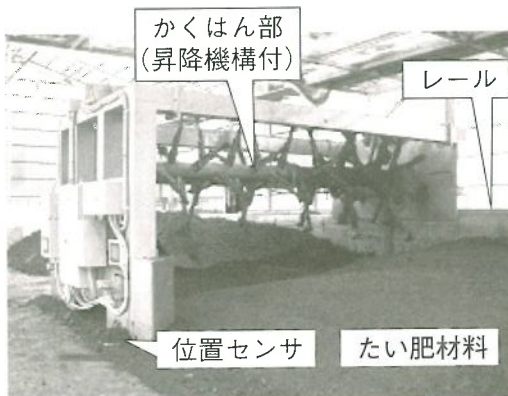


図3 品質管理型たい肥・自動混合かくはん装置

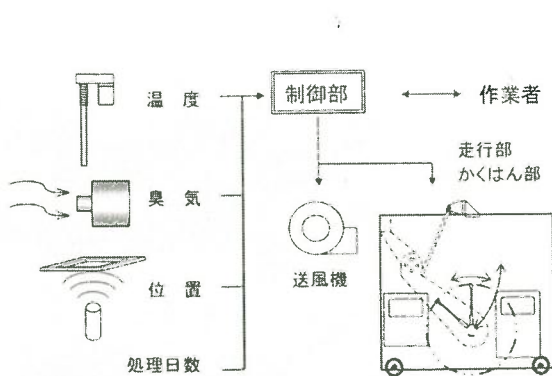


図4 品質管理制御システムの概要

することが可能であり、たい肥化処理の促進を図ることができる。従って作業者はたい肥材料の投入とたい肥の搬出のみ行う。たい肥材料の投入位置、たい肥化処理日数、たい肥材料の温度等は品質管理制御システムによって認識され、そのデータに応じて通気量及び通気時間が制御される。また、処理日数、温度、臭気の各データによりたい肥化処理状況やたい肥化一次処理の終了時を把握する。

3) 装置の性能

群馬県畜産試験場において、牛舎から搬出されたたい肥材料を用い、自動制御による通気と週1回のかくはん条件でたい肥化処理を行った。その結果、たい肥材料温度60℃以上を2日間以上維持しつつ、4週間でたい肥材料の有機物を30%程度分解できる見通しが得られた。また、臭気センサ等でたい肥化処理状況やたい肥化一次処理の終了時を把握できる可能性が得られた。

5. 自然エネルギー活用型高品質たい肥化装置

1) 装置の基本コンセプト

本装置は、搾乳牛50頭相当（処理量3.6t/日程度）の戸別農家が対象である。通気型たい肥舎をベースとし、通気の自動制御と太陽光発電システムの活用により、たい肥化処理の効率化、運転費の低コスト化を図り、4週間で確実にたい肥化一次処理を終了することを目標として開発した。品質管理型たい肥自動混合・かくはん装置と同様に一次処理において有機物分解率30%程度、たい肥材料温度60℃以上を達成し、高品質なたい肥を生産することがねらいである。

2) 装置の概要

本装置は、週1回程度のかくはん作業をショベルローダ等で行う通気型たい肥舎をベースとし、たい肥材料の温度情報、処理日数等に基づ

表3 自然エネルギー活用型高品質たい肥化装置

たい肥化方式		通気型たい肥舎
通気型発酵槽	面積 (m ² /槽)	24 (4m×6m)
	槽数 (槽)	4
設定通気量 (L/分/m ³)		70
通気用送風機 (W/槽)		400
切返し回数 (回/週)		1
太陽光発電電力 (kW)		3
マルチサーモプロープ	長さ (mm)	1,850
	質量 (kg)	4.5
	測定点数 (点)	8



図5 自然エネルギー活用型高品質たい肥化装置

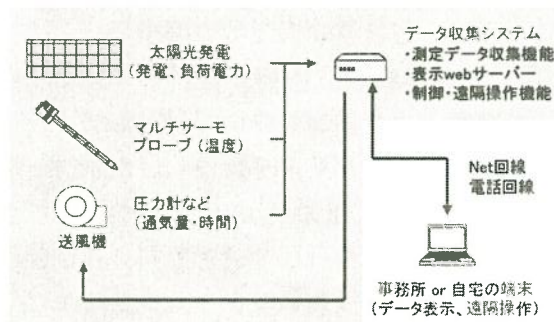


図6 たい肥化制御システムの概要

いて通気量と通気時間の最適化を図る。たい肥材料の投入、かくはん作業、たい肥の搬出等は作業者が行う。4槽の通気型発酵槽、通気を自動制御及び遠隔管理するたい肥化制御システム、太陽光発電システム等で構成する（表3、図5、図6）。たい肥化制御システムは、たい肥材料の堆積高さ別の温度を測定できるマルチサーモプローブ、通気量を測定できる風量センサ、たい肥化処理日数等によってたい肥材料の発酵状況を把握し、通気量及び通気時間を制御する。インターネットの活用可能なモニタリング機能により、たい肥材料の発酵状況をどこからでも把握できるため、たい肥化装置の集中管理も可能である。また、太陽光発電による電力（設備電力3kW）をたい肥化装置の通気用送風機（400W、4台）の電力に利用できる。

3) 装置の性能

北海道、愛知県、鹿児島県の農家に試作機を導入し、それぞれ牛舎から搬出されたたい肥材料を用いて通気量約70L/分/m³、通気時間6時間、週1回のかくはん条件でたい肥化処理を行

った。その結果、いずれの試験地においても60℃以上のたい肥材料温度を2日間以上維持し、4週間で有機物分解率30%程度を達成できる見通しが得られた。

6. おわりに

高精度固液分離装置を使うことによりオガ屑等の副資材が不要となり、たい肥の安定化を図る二次処理の期間が大幅に短縮され、施設規模の縮小化も期待できる。また、2つのたい肥化装置は、誰でも高品質なたい肥を作ることができる装置として開発した。開発したこれらの装置が環境負荷の低減とたい肥を利用した土作りによる物質循環を促進し、環境保全を重視する農業に寄与することを期待したい。最後に、これらの装置は、共同研究企業である(株)クボタ、松下エコシステムズ(株)を始め、平成機工(株)、日環エンジニアリング(株)、民間牧場、筑波大学、宇都宮大学、県の試験場等の多大なご協力により、開発を進めてきたものであり、ここに改めて謝意を表す。

◀国内情報▶

不定胚経由のスギ個体再生技術の開発

独立行政法人 森林総合研究所 生物工学研究領域

伊ヶ崎 知 弘 ・ 篠 原 健 司

被子植物で報告されているファイトスルフォカイン (PSK) は、細胞増殖活性のみならず、細胞の特定の組織や器官への分化にも効果を持つことが知られている。本研究では、裸子植物のスギにもPSK前駆体遺伝子が存在することを発見し、PSKを利用して効率的にスギ培養細胞から不定胚へ分化させる技術を開発した。この技術は、スギの遺伝子組換えに応用可能で、花粉アレルギーを生産しないスギの作出など、スギ花粉症対策の新技術としての活用が期待される。

1. はじめに

スギは日本の主要林業樹種で、加工が比較的容易であること、生育する土地の制限が少ないことなどの特性を持ち、古くから建材などに利用され、人工的に植栽されてきた。しかし、価格の安い外国材が輸入されると、スギの需要は激減し、その減少傾向に歯止めが掛かっていない。一方、吉野スギなど一部の地域で生産される品質の良いスギは、ブランド化され、現在でも建材としての人気が高く、高値で取引されている。

樹木は永年性で、生殖活動を開始するまでの期間が極めて長く、しかも、遺伝的に不均一で、交雑育種による品種改良には不向きである。交雑育種を進めるならば、広大な敷地と長い年月が必要となることは言うまでもない。遺伝子組換え技術は、もとの植物の望ましい形質を保持させたまま、目的とする単一の形質のみを選択的に改変する技術で、付加価値の高い新品種が比較的容易に短期間で作出できるという特徴がある。それには、目的の形質を支配する遺伝子、アグロバクテリウム法やパーティクルガン法による安定な遺伝子導入技術、効率の良い個体再生技術が必要である。

森林総合研究所では、スギの花粉アレルギー
IGASAKI Tomohiro, SHINOHARA Kenji
〒305-8687 つくば市松の里1

遺伝子¹⁾や雄花の形態形成を支配する遺伝子²⁾などを単離してきた。また、パーティクルガン法によるスギへの遺伝子導入技術の開発にも成功している³⁾。本研究では、再現性の高いスギの個体再生技術を開発し⁴⁾、さらに、細胞増殖因子ファイトスルフォカイン (PSK) を利用した高効率の個体再生系を開発した⁵⁾。

2. スギ培養細胞からの不定胚作出

スギは挿し木による増殖や、多芽体の作出技術により試験管内挿し木で大量増殖が可能である。しかし、本研究に着手した当時は、培養細胞などを経由した個体再生系が無く、さらに細胞培養などの利用可能な基礎データの蓄積もなかった。植物の個体再生系は2つに大別される。1つは、芽や根など植物の器官を作出し、そこから不足する器官を再生し植物体にする系で、もう1つは、種子中の胚に相当する器官 (不定胚) を作出し、それを発芽させ、植物体にする系である。マツやトウヒなど一部の針葉樹では、後者の系が確立されていたので、それらを参考に、スギについて培地の成分や植物ホルモンの種類・濃度などの諸条件を詳細に検討するという作業を繰り返した。そして、米国とニュージーランドで特許が認可されているSmithの培地⁶⁾を用いた場合に、低頻度ながらスギにおいても不定胚が形成した。その後も各ステップで培

A

Y(SO₃H)-I-Y(SO₃H)-T-Q

(チロシン)(イソロイシン)(チロシン)(スレオニン)(グルタミン)

B

```

atggcgaatatcctctggaagaagtccctacaccctttgcatattatgtgtcattcttcttctgtactgaccactgcaatggcaaccgcg 90
M A N I S G R S P Y T L C I L C V I L L L V L T T A M A T R

ccacttaaacagatcttgcctccacagaggatctgctcaaacagctacagaagacaacttgcaggaatcttttcaacagggctcttaaa 180
P L K T D L L H R G S A Q T S T E D N L Q E S F Q Q G A L K

gctgacctgttgaggagagctacagaggaattaagctgtgaaggcttagaggaagaagaatgtctgaaccgtcgctctctggctgctcac 270
A D L L E E S T E E L S C E G L E E E E C L N R R S L A A H

actgattacatctatacacagcaccacaaacaccatag 309
T D Y I Y T Q H H K H P *

```

C

CjPSK1	59	LKADLLEESTEELSCEGLE EE EEEC	•	LNRR	•	SLAAHTDYIYTQHKKHP	102
AtPSK1	43	EKASTKGD RD RGVECKNSDS EE EEEC	•	LVKK	•	TVA A HTDYIYTQDLNLS	87
AtPSK2	44	KIEGKLDDMHMVDENCGADDED C	•	LMRR	•	TLVAHTDYIYTQKKKHP	87
AtPSK3	38	SVEEDSVNKLGMMEYCGEGDE EE C	•	LRRR	•	MMTESHLDYIYTQHKKH	81
AtPSK4	37	SVKEIEGDKVEEESCNIGI EE EEEC	•	LIRR	•	SLV L HTDYIYTQNHKP	79
AtPSK5	34	EENSFKLEQGEVIC EE GV EE EEEC	•	FLIRR	•	TLVAHTDYIYTQNHNP	77
AtPSK6	44	EMIESKLHEVAGESCDKEDDED C	•	LVRR	•	TLTAHLDYIYTHKNNHH	87
OsPSK1	45	TTTQ EE PSRENGGSTGSNNNG EE LO EE FDSA K	•	WEEF	•	HTDYIYTQDVKNP	89

図1 スギのPSK

(A) 活性型PSKの構造。(B) スギPSK前駆体タンパク質 (CjPSK1) 遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列 (1文字表記)。白抜き文字はPSKをコードする部分を示す。(C) CjPSK1とシロイヌナズナ及びイネのPSK前駆体タンパク質遺伝子 (AtPSK1~6, OsPSK1) の推定アミノ酸配列の比較。白抜きは共通アミノ酸を、シャドーは類似性の高いアミノ酸を示す。

地組成や植物ホルモン濃度を詳細に検討したが、さらなる向上は見られず、Smithの培地を基本とする培地を用いた場合に実験が再現するだけであった。

3. スギPSK前駆体遺伝子

PSKは硫酸化されたチロシン残基2つを含む5つのアミノ酸からなるペプチド(図1A)で、細胞の増殖や、特定の方向性を持った組織や器官への分化など、植物ホルモン様の作用を持つことが知られている。PSKは核ゲノム上の遺伝子によりコードされ、前駆体タンパク質が修飾

や切断を受けることにより生成する。これまで、アスパラガス、ニンジン、イネ、シロイヌナズナといった被子植物でその存在が確認されていた。本研究により、裸子植物であるスギにもPSK前駆体タンパク質をコードする遺伝子が存在し、その遺伝子が発現していることを発見した。スギPSK前駆体遺伝子は102アミノ酸からなるタンパク質(CjPSK1)をコードし(図1B)、アミノ末端側の分泌シグナルや、中間部の酸性アミノ酸残基が豊富な部分が存在することなど、大まかな構造では他の植物のPSK前駆体タンパク質と類似していたが、PSK及びその直前の部分の配列以外に相同性の高い領域は存

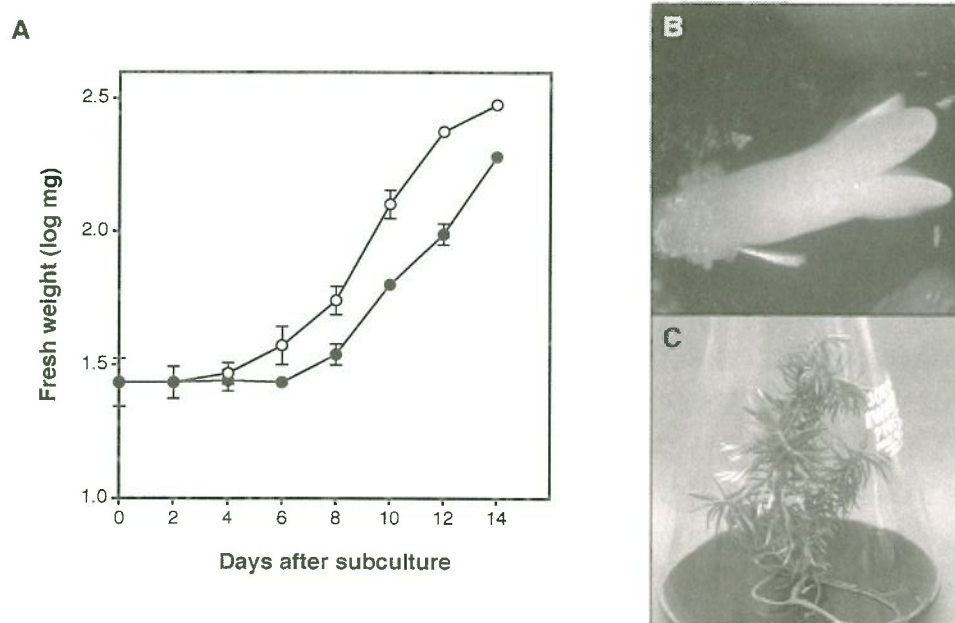


図2 スギ培養細胞に対するPSKの効果

(A) スギ培養細胞の増殖曲線。○は培地中にPSKを32nM添加した場合、●はPSKを添加しなかった場合。
 (B) スギ不定胚の拡大写真。(C) 不定胚から成長した幼植物体。

在しなかった (図1C)。

4. PSKのスギ不定胚分化に及ぼす効果

PSKは細胞増殖効果や細胞の組織・器官への分化に効果を持つことが報告されており、スギにおいて同様の効果を示すか調べた。増殖培地へのPSKの添加により、初期の細胞増殖が促進した (図2A)。この結果は、スギに対してもPSKが被子植物の場合と同様の効果を持つことを示唆している。また、不定胚分化培地にPSKを添加した実験では、PSKを添加しない場合と比較して、不定胚への分化効率が顕著に上昇した (図2B)。PSK存在下で誘導した不定胚の多くは正常に発芽し、幼植物体へと成長した

(図2C)。さらに、PSKを添加した培地で培養細胞を維持すると、細胞分裂活性の低下や細胞の褐変が抑制され、細胞の不定胚分化能力が長期間にわたり保持された。現在、誘導後3年以上を経過した培養細胞を引き続き維持しているが、それらの細胞は不定胚分化能を未だに保持している。このように、PSKを利用することで、高効率で安定なスギの個体再生系の開発に成功した。

5. おわりに

我が国ではスギ花粉症患者が人口の2割を占め、大きな社会問題となっている。すでに、スギ花粉症の主要アレルゲンとしてCry j 1とCry

j 2の2種類のタンパク質が同定されており、その遺伝子も単離されている。したがって、本研究で開発した個体再生系を利用し、これらの遺伝子の発現を抑制するような遺伝子組換えを行うことで、花粉でアレルギーを生産しないスギを作出することが可能となったと言える。この組換えスギは、現状の花粉症に直接効果を及ぼすものではないが、スギ林を更新する際に植栽することで、確実に花粉症を軽減することができるものと期待できる。今後は、開発したスギ個体再生技術を利用して、組換えスギの作出を目指したい。

文 献

- 1) Futamura, N. et al (2002), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2495-2500
- 2) Fukui, M. et al (2001), *Plant Cell Physiol.*, 42, 566-575
- 3) Mohri, T. et al (2000), *Plant Biotechnol.*, 17, 49-54
- 4) Igasaki, T. et al (2003), *Plant Cell Rep.*, 22, 239-243
- 5) Igasaki, T. et al (2003), *Plant Cell Physiol.*, 44, 1412-1416
- 6) Smith, D.R. (1996), *U.S. Patent no.5*, 565, 355



ブレイン テクノニュース
バックナンバーのご案内
第104号
2004年7月15日発行

特 集 「エピジェネティクス研究の現状と展望」

- 1 哺乳類におけるエピジェネティクス研究の現状と展望
.....塩田 邦郎
- 2 植物分野におけるエピジェネティクスの現状
.....星野 敦・飯田 滋
- 3 マウス単為発生胚の誕生? 哺乳類の生殖戦略?
.....河野 友宏

国内情報

分画したダイズタンパク質の機能性とダイズ種子プロテオームデータベースの構築.....森山 達哉・丸山 伸之
ABA不活性化酵素CYP707遺伝子の同定と機能解析

- 休眠種子の覚醒遺伝子 -

.....南原 英司・岡本 昌憲・久城 哲夫
塩素系薬剤によるリグニンの分離に伴うクロロホルムの発生とその拡散防止.....真柄 謙吾
土壌サンプル粉碎篩分け装置
.....後藤 隆志・手島 司・市来 秀之・清水 一史

地域の先端研究

「アクアDNAブック」の作成とその活用について
.....長谷川 理・岡本 信明・藤 加菜子・林崎 良英ほか

文献情報

オプシン処理への腔内留置型黄体ホルモン製剤の併用は、哺乳中の黒毛和種への定時授精における受胎率を向上させる.....(抄訳：下司 雅也)
魚の高活性不凍タンパク質.....(抄訳：千葉 智)
酵母*S. cerevisiae*におけるグルタチオンを介する無毒化経路.....(抄訳：高岡 康道)
一酸化窒素合成酵素、植物でついに発見.....(抄訳：岩井 純夫)

生研センターからのご案内

◀地域の先端研究▶

世界で初、種子なしビワの開発

千葉県農業総合研究センター 暖地園芸研究所
八幡茂木

ビワは種子の占める重量割合が15~20%と極めて高いことから、消費者からは無種子化の技術開発が望まれていた。そこで千葉県農業総合研究センター暖地園芸研究所では、三倍体を利用した種子なしビワ作出技術の確立に取り組む、その作出方法を確立した。併せてこの技術に対応する種子なしビワ専用品種‘希房’を選抜し、品種登録を出願した。種子なしビワには、消費者・生産者待望の新商品として大きな期待が寄せられている。

1. 作出の背景

ビワは果実が小さい割には種子の存在が甚だ気になる果物である。実は可食率は70%と果物の中では高いはずなのだが何か損をした感じがする。こんなことから、昔から「種子のないビワが食べたい……」という消費者の願望は根強いものがあつたのではないかと想像される。

一方、日本の食習慣の中では果物は食間の嗜好品とみなされることが多い。昔から水菓子ともよばれていて、今でも生食用のテーブルフルーツとしての需要が最も多い。このため、外観が美しい、種子がないなどの付加価値のついた果実特性は、消費者にとって購入する上での重要な選択肢となっている。今日の果樹の育種においては種子なし化が目標の一つになっている。

2. 三倍体の利用と植物成長調整剤処理技術の併用

ブドウでは、花あるいは幼果に植物成長調整剤を処理する技術によって人為的な種子なし化技術が確立し、‘デラウェア’、‘巨峰’などの種子なし品種が市場に流通している。当然、種子なしビワの作出においても同じ技術を利用することが考えられるが、二倍体の種子ありビワ

YAHATA Shigeki

〒294-0014 館山市山本1762

品種を用いた場合には、処理効果が不安定で、種子あり果実が混入してしまう欠点があり、経済栽培することが難しい。ブドウと異なる点は、二倍体ビワは種子形成力が極めて強いいため、植物生長調整剤の処理のみでは種子が無くならない。

そこで、ビワの今回の無種子化技術の開発にあたっては三倍体を利用することにした。一般に三倍体の植物は受精に不都合が生じて種子が形成されにくいといわれているが、九州大学の村西氏はビワの三倍体をはじめて作出し、ジベレリンを処理することによって、完全な種子なし果実が得られることを明らかにした。暖地園芸研究所ではこの成果に注目し、商品性のある種子なしビワ生産を目標に、三倍体ビワに与える植物生長調整剤の種類、時期、濃度、回数を検討した。その結果、従来から利用されてきたジベレリンにホルクロルフェニユロン (CPPU) を加用し、この水溶液にビワ開花期前後の花蕾(幼果)を浸漬処理することにより、種子あり果実と同等の大きさ、品質を備えた種子なし果実が得られることが明らかになった。この処方

3. 三倍体および四倍体ビワの育種

しかし、既存三倍体を供試して現地で実証栽培をしてみると、正品果率が50%前後と低いことが判明した。そこで、作出技術に適した種子

なしビワ品種を新たに育成し，品種面から摺り合わせて，正品果率を向上させることにした。

ビワ倍数性育種においては，まず二倍体ビワをコルヒチン処理して染色体数を倍加させ人為四倍体 ($4x=68$) を作出する。次いで二倍体ビワ ($2x=34$) と四倍体ビワ ($4x=68$) を交

雑し，その実生から三倍体 ($3x=51$) を得る。すべてが三倍体になるとは限らないので，倍数性を検定して三倍体を選び出す (図1)。

実際には，1991年に四倍体の‘田中’実生の花に二倍体の数品種を花粉親として交雑し，得られた実生およそ200個体の中から40個体の三倍体を選び，結実した個体から順次特性調査を行った。‘希房’はその中の1個体で，1999年に初着花し，2002年に優良系統として選抜した。農林水産省への品種登録出願は2003年9月に行い，2000年4月に出願公表された。

作出した種子なしビワの可食部分の重量割合は90%と高く，種子あり果実より20%も多くなる (表1)。果実断面を見ると中心部分に空洞ができるものの，種子がない分だけ果肉の厚みが増加した (図2，図3)。また，食味も種子あり品種と同等で，商品化率も85%に向上した。この

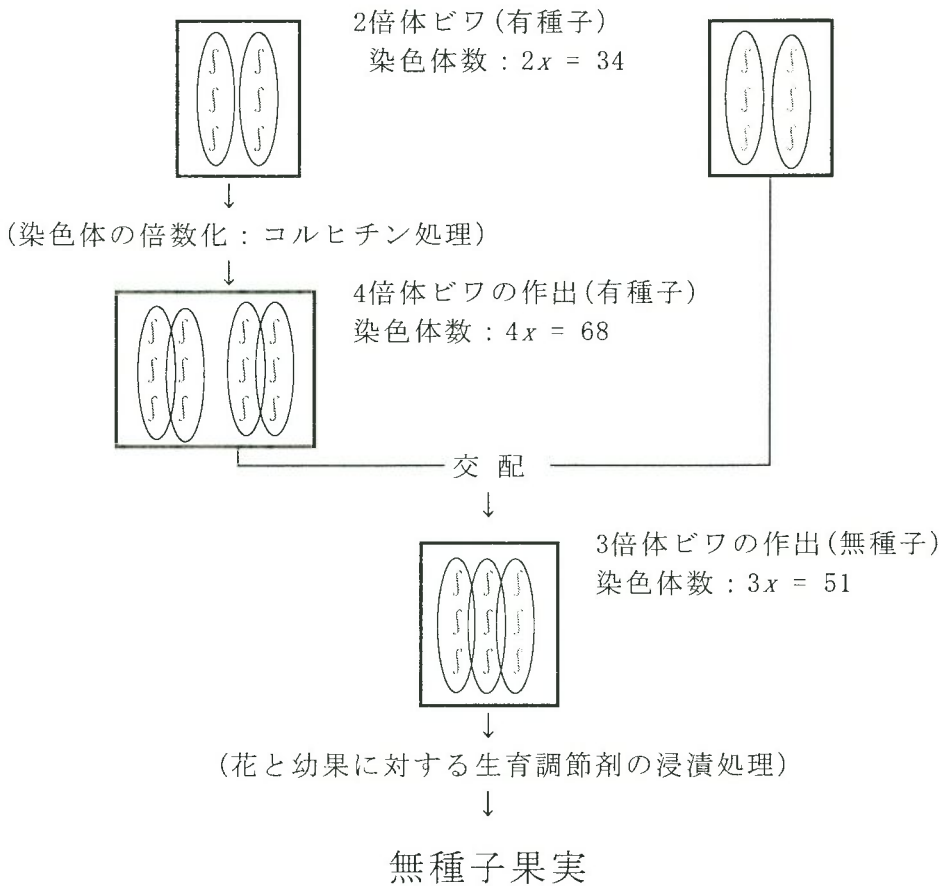


図1 種子なしビワの作出過程

表1 ‘希房’の果実特性

(施設栽培樹，1999年～2002年平均)

品種 (倍数性)	収穫日 (月, 日)	平均果重 (g)	果形指数 (横径/縦径)	果肉重量割合 (%)	果形	果色	緑斑	糖度 (Brix)	酸度 (g/100ml)	果肉硬度 (kg/cm^2)
希房 (3倍体)	5.25	69	0.75	91	長卵	橙黄	軽	11.5	0.22	0.51
富房 (2倍体)	5.21	72	0.99	71	短卵	橙黄	無	11.6	0.21	0.58

‘希房’：種子なしビワ，‘富房’：種子ありビワ

ような形態的な変化は消費者の期待に十分に応えるもので、ビワに関して新しい商品を開発するという当初の目的が達成された。

4. おわりに

‘希房’の育成を発表した際には全国的に大きな反響があり、生産者、市場関係者および消費者からは大きな期待が寄せられている。千葉県では産地振興のために本品種導入の気運が高く、産地への円滑かつ確実な定着が要望されている。

そこで、千葉県農業総合研究センターでは2000年度から国の委託を受けて高度化研究事業を立ち上げ、‘希房’に特定して「大苗の早期育成技術」、「植物生長調節剤の処理技術の改善」、「出荷果実の品質管理技術」および「DNA品種鑑別による権利保護」の4課題を設定し、産地定着に関する技術開発を行っている。この成果を活用して‘希房’の迅速な産地導入と生産体制の確立を図り、3年後には種子なしビワの生産と市場への流通を見込んでいる。将来的には、千葉県生まれの種子なしビワが全国

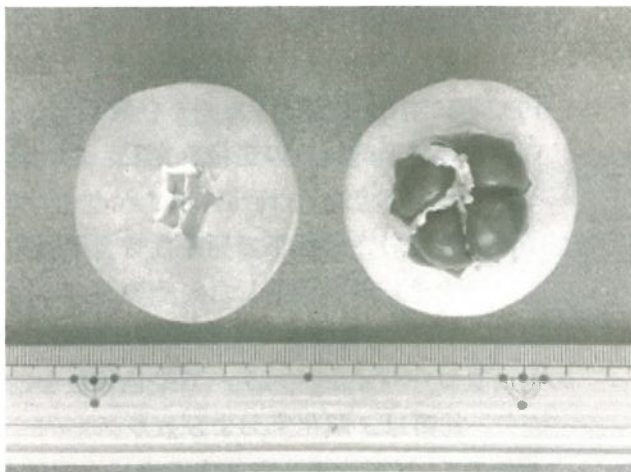


図2 ‘希房’の樹上果実

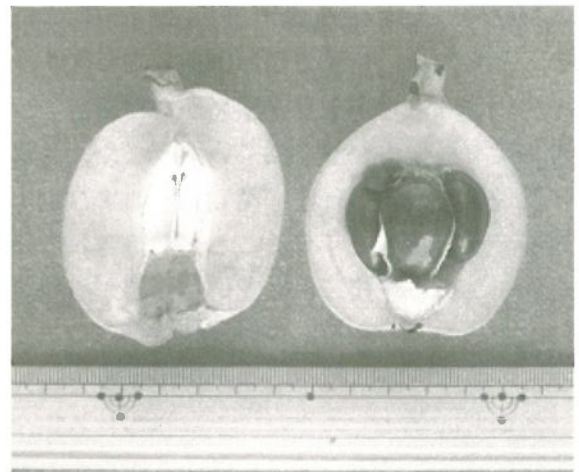
的に認知され、ビワの新ブランドになることが期待される。

文 献

- 1) 村西三郎 (1979), 園学要旨, 68-69
- 2) 八幡茂木ら (1998), 園学雑 (別2), 199



果肉の厚さは1.5～2倍に増加



果実中央部に空隙

図3 ‘希房’の横断面及び縦断面
(左: ‘希房’, 右: ‘富房’)

◀地域の先端研究▶

3倍体無核スダチ新品種‘徳島3X1号’について

徳島県立農林水産総合技術センター 果樹研究所

徳 永 忠 士

‘徳島3X1号’は、1992年に本田系四倍体スダチと緑香系スダチを交配して得られた三倍体無核スダチの新品種である。‘徳島3X1号’の樹勢はやや強く、節間が長いために枝が垂れやすい。大きい刺が発生するが、結果枝では次第に小さくなる。果皮がやや粗いが、ほぼ無核で鮮やかな緑色の果肉を有しており、果汁は非常に豊富である。現存するスダチの中で最も早く収穫を開始する事が可能である。

1. はじめに

スダチは徳島県特産の香酸カンキツであり、栽培面積は果樹全体の約12%を占める基幹作物の一つである。しかし、スダチは果実が小さい割に種子が多いため、消費者からは種子を取り除く煩わしさが、加工業者からは搾汁率の悪さや残渣の多さが指摘されている。

スダチには在来の無核系統が存在し、個人販売として一部の農家が栽培しているものの、それらは果実が小さいために市場での単価が安く、また樹勢が弱いために大量生産は望めない。また、高単価が期待できる2L級果実では数個の種子を含むこともあり産地化はされていない。そのため、無核で商品価値の高い大きさの果実になり、しかも安定生産ができる新しい無核スダチの作出が望まれていた。また、スダチの種子をなくすことは、消費拡大および加工時の残渣の軽減に寄与することが期待される。

カンキツの無核果には三倍体作出が有効な手段の1つであると考えられ、二倍体同士の交雑により得られる小粒種子から作出する方法^{1,2)}、二倍体と四倍体との交雑により得られる完全種子^{3,4)}または不完全種子^{5,6)}から作出する方法が報告されている。これらの方法を用いて、アメリカで‘Oroblanco’⁷⁾および‘Melogold’⁸⁾が育成されており、我が国でも三倍体キンカン

TOKUNAGA Tadashi

〒771-1320 徳島県板野郡上板町神宅字祝谷1

‘プチ丸’が育成された⁹⁾。これらは全て種子親が単胚性品種であった為、三倍体の交雑実生が得やすかったが、多胚性の温州ミカンを種子親に用いた三倍体の作出にも成功している¹⁰⁾。

当研究所では1990年から三倍体スダチの作出および新品種育成に取り組んできた。その結果、‘徳島3X1号’を育成し、2004年6月4日に品種登録された(登録番号：第12068号)。そこで本報では、国内では‘おちまる’に続く2回目、多胚性カンキツとしては初めてとなる実用的な三倍体品種である‘徳島3X1号’の育成経過および特性を紹介する。

2. 育成経過

1992年に本田系四倍体スダチを種子親とし、二倍体の緑香系スダチの花粉を交配した。得られた種子はMT培地(murashige and tucker)で胚培養を行い、暗黒下で発芽させ2週間育成したカラタチに割り接ぎした。その際、根端を採取し、押しつぶし法で染色体数を調査した。のちにフローサイトメーターで染色体数を確認した¹¹⁾。幼苗は、順化室およびガラス室内で育成したのち、ビニールハウス内でポット栽培し、1995年に圃場に定植した。

圃場に定植した年に初結実し、無核で鮮やかな果肉色をしていることから、翌年に二次選抜し、徳島県内10軒のスダチ農家圃場において現地試験を開始した。

表1 徳島3X1号の果実品質

系統名	調査日	果実重 (g)	横径 (mm)	縦径 (mm)	果皮色	果肉色	完全 種子 (個)	不完全 種子 (個)	果皮厚 (mm)	果汁 歩合 (%)	Brix (%)	クエン酸 (%)	香り
徳島3X1号	8/13	20.3	36.4	29.8	暗緑	明黄緑	0.0	0.4	3.1	32.4	8.0	6.66	スダチ
本田系スダチ	8/27	24.0	37.5	31.4	暗緑	浅黄緑	8.6	1.4	2.8	26.8	8.2	6.63	スダチ
新居系スダチ	8/27	12.6	30.2	24.5	濃黄味緑	浅黄緑	0.4	0.0	2.4	28.8	8.0	6.68	スダチ

その結果、スダチとしては早生で、品質良好であることが明らかとなったので、2000年春に種苗法に基づく品種登録申請を行った。

3. ‘徳島3X1号’の特性

樹勢はやや強で、樹の大きさは中、樹姿はやや開張性である。枝梢の太さは通常のスダチよりも太いが、節間が長く、放任すると枝が垂れ、分岐部から折れやすくなる。刺は大きく長い、着果枝は短くなる傾向がある。葉身の形は卵形、波状の程度は中、網脈は不明瞭である。花序の形成は端正、花の重さは軽、花卉の形は紡錘形で長さは短く幅は広い。また花卉の数はスダチが5枚であるのに対して‘徳島3X1号’は3～5枚が混在し、平均で4枚である。花粉は多いが発芽能力はほとんどない。

‘徳島3X1号’の果実は、本田系と同等かやや大きいが、果皮はやや粗く厚いため外観は本田系よりもやや劣る。しかし、完全種子は平均1個以下でほぼ無核であり、果肉は鮮やかな緑色で非常に美しい(表1, 図1)。また、果汁歩合が高くなるのが早く、7月下旬～8月上旬には出荷が可能となる。品質検討会でも高評価であり、香りについては今までのスダチとほとんど変わらないという意見と、よりフレッシュでフルーティーであるという意見が聞かれた。

‘徳島3X1号’は無核で高品質果実生産が期待されるだけでなく、収穫期が7月下旬～8月上旬と早く、徳島県の特徴であるお盆需要に出荷できること、またスダチ農家の収穫労力の分散、経営規模の拡大等に寄与するものとして期待されており、2005年の春から全農徳島を通じて苗木が供給され、8000本以上の苗木が徳島県内に定植される予定であり、今後も栽培の増加が見込まれている。

文 献

- 1) Lapin, W.K. (1937), *U.S.S.R. All-Union Sci. Res. Inst. Humid Subtropics Works*. 1: 1-68.
- 2) Esen, A. and R. K. Soost. (1971), *J. Hered.* 62: 329-333.
- 3) Longley, A.E. (1926), *Washington Acad. Sci.* 16: 543-545.

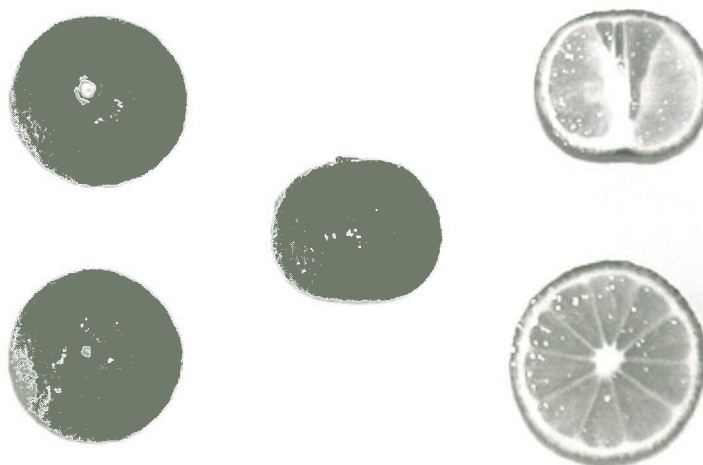


図1 ‘徳島3X1号’の果実

4. おわりに

- 4) Frost, H. B. (1948), *University of California Press, Berkley and Los Angeles*, 817-885.
- 5) Starrantino, A. and G. R. Recupero. (1981), *Proc. Intl. Soc. Citricult.* 1: 31-32.
- 6) Oiyama I. et al. (1991), *HortScience* 26: 1082.
- 7) Soost, R.K. and J.W. Cameron. (1980), *HortScience* 15: 667-669.
- 8) Soost, R.K. and J. W. Cameron. (1985), *HortScience* 20: 1134-1135.
- 9) 吉田俊雄ら (2000), 園学雑69別1: 226
- 10) 金好純子ら (1997), 園学雑66(1): 9-14
- 11) 竹中美香ら (1997), 徳島果試研報25: 17-20



ブレインテクノニュース
バックナンバーのご案内
第103号
2004年5月15日発行

総説

カイコゲノム全塩基配列の解読……………三田 和英・佐々木卓治

国内情報

カイコゲノムに散在するトランスポゾン……………行弘 研司

昆虫ホルモンレセプター研究とカイコゲノム情報……………塩月 孝博

マイクロアレイの利用によるカイコの発現遺伝子の解析

……………野田 博明・三田 和英・嶋田 透

SuperSAGE法による真核生物の遺伝子発現解析

……………松村 英生・寺内 良平

遺伝子改変マウスの環境化学物質モニターへの応用

……………高橋 智・本橋ほづみ・伊藤 健・依馬 正次

搾乳ユニット自動搬送装置の開発……………平田 晃・後藤 裕
砂糖・エタノール生産のための株出多収性サトウキビ（モン
スターケーン）の開発……………杉本 明

地域の先端研究

ハナサキガニの完全養殖……………橘高 二郎

非病原性フザリウム菌を用いたサツマイモつる割病の防除

……………渡邊 健

文献情報

ウシ卵管内および子宮内の局所pH ……………(抄訳：下司 雅也)

脂肪酸及び脂質を多く含む魚の摂取と中年層における認識

能力の関係……………(抄訳：高見 幸司)

一酸化窒素は側根発生に関係している……………(抄訳：岩井 純夫)

OXI1キナーゼはシロイヌナズナの酸化的バーストを介する

シグナル伝達に必要である……………(抄訳：吉川 彰)

生研センターからのご案内

◀地域の先端研究▶

倍数性合成周縁キメラによる種なし香酸かんきつの開発

全農愛媛県本部 青果事業部

協塚 巧 ・ 井上(稲田)絵理子 ・ 西山 聡

レモン(二倍体)とタヒチライム(三倍体)を用い、倍数性種間合成周縁キメラのかんきつを開発することに成功した。倍数性が異なる合成周縁キメラのかんきつとしては初めての例で、種なし品種開発の新しい方法を示すことができた。レモンとタヒチライムからできたキメラは、果皮が薄く種なしで、新しい香酸かんきつとして実用価値も高いと予想される。

1. はじめに

三倍体の不稔性利用は、果物などの種なし(無核化)を目指すうえで有効な手段の一つである。通常、三倍体の育成には、まず、四倍体を育成し、二倍体との交雑により三倍体を得る方法が多く実施されている。かんきつ類において、この育種プログラムを実施する場合、相当長い年月を設定する必要がある。開花までの幼齢期間が長いためである。

かんきつ類では、近縁の属を含めても自然の倍数性変化はきわめて少ないが、経済栽培されている三倍体として、タヒチライム(*Citrus latifolia* Tanaka)が古くから有名である。ライムの一種とシトロンの自然交雑種と言われている。また、育種プログラムにおいて育成された三倍体かんきつの中には、カリフォルニア大学の'Oroblanco'(スウィーティー)のように、すでに経済的な位置を占めている品種もある。国内でも、いくつかの三倍体育成が報告され、最近では、キンカンの'ぶちまる'((独)農業・生物系特定産業技術研究機構 果樹研究所)や、スダチの'徳島3X1号'(徳島県果樹研究所)の育成が注目される。

(株)愛媛柑橘資源開発研究所は、すでに数多くの種間合成周縁キメラのかんきつを開発した

WAKIZUKA Takumi, INOUE INADA Eriko,

NISHIYAMA Satoshi

〒790-8555 松山市南堀端町2-3

1, 2)。この合成キメラ技術を活用し、短期間で可能な無核かんきつの開発を目指した。つまり、既存の三倍体を利用し、その茎頂起原層3層のうち、最外層の第1層(L1)のみを別の二倍体と入れ替えた倍数性合成周縁キメラを想定した。

このタイプのキメラが実現する可能性については、不明な点もあった。永年性木本植物において実例がないこと、二倍体がほとんどのかんきつ類において、倍数性合成周縁キメラの構造が成立し、その構造を維持して結果期まで成育できるかどうかの実証がないことである。合成キメラではないが、変異による二倍性と四倍性の倍数性キメラかんきつと考えられている例として、日向夏の'白鳥日向'³⁾、あるいは、茎頂分裂組織のTunica-Corpus Theoryの検証が盛んにおこなわれた1940年代のマンダリンの報告がある⁴⁾。

もし、二倍性と三倍性の倍数性周縁キメラを自由に合成することができれば、二倍体種(品種)と三倍体種(品種)の合成キメラによる無核かんきつや、さらに将来は、同一品種による倍数性合成キメラの利用も検討できる。そして、三倍体自体に、品種開発の母本的な意味を見出すことが可能となる。

このため、レモン(*Citrus limon*(L.)Burm.f. 'Allen Eureka')とタヒチライムを用い、二倍性と三倍性の組織から成る倍数性合成周縁キメラが成立するかどうか、および、デザインド

おりの果実が得られるかどうかを検証した。

2. 新しい香酸かんきつのデザイン

世界のかんきつ産業の中で、香酸かんきつは重要な位置にある。レモンとライムの世界生産量は、およそ1,200万トンである。オレンジの6,000万トンには及ばないが、みかんなどのマンダリン類のおよそ半分、グレープフルーツ類の2倍にも相当する大きな規模である⁵⁾。

そこで、最もメジャーな香酸かんきつであるレモンに似た、新しい種なしかんきつの開発を目指し、2001年、果樹では初めての倍数性種間合成周縁キメラの開発をスタートした。

これまでに開発したかんきつの種間合成周縁キメラの特性から、果皮の特性や樹体・樹勢は茎頂起原層第2層および第3層(L2・L3)を構成する種に依存し、可食部分であるさじょうでは両種の細胞が共存することが明らかになっている。これらの知見を基に、L1がレモン(二倍体)、L2・L3がタヒチライム(三倍体)

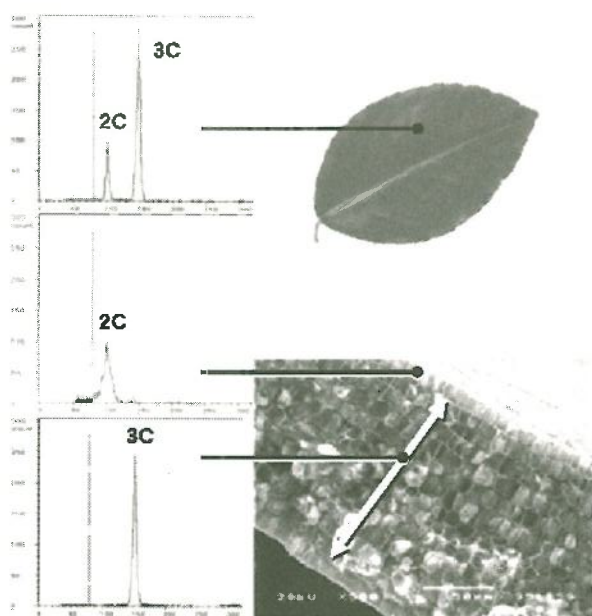


図1 フローサイトメトリーによる倍数性合成周縁キメラの倍数性分析例

上：全葉、二倍性細胞と三倍性細胞、中：表皮細胞、二倍性細胞のみ、下：葉肉細胞、三倍性細胞のみ

で構成された倍数性種間合成周縁キメラをデザインした。実現すれば、無核で果皮は薄く、新しい食味食感の果肉特性を持つ新しい香酸かんきつが現れるはずである。

3. レモンとタヒチライムの合成キメラの開発

タヒチライムの新梢組織とレモンの珠心胚実生胚軸の水平上下接ぎ木の接合部からの不定芽を育成し、DAPI染色によるフローサイトメトリーで倍数性分析を行った⁶⁾。不定芽75個体の葉を詳細に分析した結果、レモンと同じ2Cの位置とタヒチライムと同じ3Cの位置の両方にピークを示す2個体を得、これらは、レモンとタヒチライムの種間合成キメラであると推定した。

これらのキメラが、周縁キメラの構造であるかどうかは、組織別の倍数性分析で明らかになる。ポリガラクチュロナーゼとセルラーゼの処理により葉の表皮と葉肉組織を分離・分析し、表皮は二倍性の細胞のみ、葉肉は三倍性の細胞のみであることを確認した。つまり、L1が二倍性、L2・L3が三倍性の倍数性合成周縁キメラであることを示した(図1)。合成キメラの形成率は、通常の子二倍体種のさまざまな種間合成周縁キメラの場合と比較して、大きな違いはなかった。つまり、二倍体と三倍体という倍数性が異なる組み合わせにおいても、合成キメラの形成率は低下しないと思われた。

果実の外観はタヒチライムに似て、果皮の厚さは薄く、ライムの香りもあり期待どおりであった。さじょうは、緑がかったライム色ではなく、より黄色いレモン色に近かった。さらに、果実各組織の倍数性分析の結果も、これまでの合成周縁キメラの構造に関して得た知見と全く矛盾はなく、安定した周縁キメラ構造であると認められた。2004年、圃場のビニール施設内の高接ぎで成育した果実は種なしであった(図2)。

なお、キメラ形質発現の基礎研究のため、層

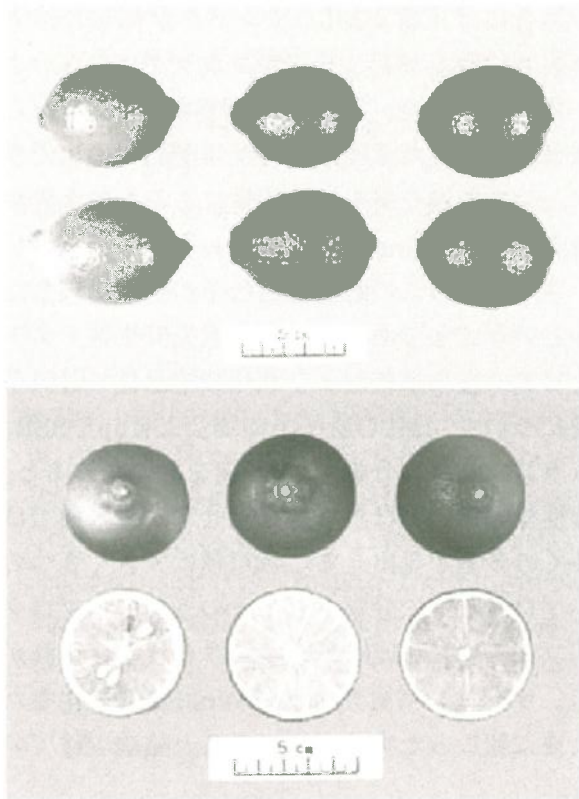


図2 レモン(二倍体)とタヒチライム(三倍体)の倍数性合成周縁キメラの果実

左：レモン(‘Allen Eureka’), 中：キメラ(L1はレモン, L2・L3はタヒチライム), 右：タヒチライム

構成が逆の、すなわち、L1がタヒチライム、L2・L3がレモンの個体も作出し、現在育成している。

4. おわりに

かんきつ類において、L1だけが二倍性細胞で、その他の内部組織が三倍性細胞の倍数性合成周縁キメラ植物の実現が可能であることを証明した。果肉形成にL1が大きく関与するかんきつ類の品種開発にとっては、きわめて大きな意味を持つ。

従来、三倍体の育種はそれ自体が、最終目標と考えられていたため、得られた三倍体の経済

的価値が低い場合、長い年月の成果にもかかわらずその後ほとんど活用されなかった。ここで紹介した倍数性合成周縁キメラ開発の成功は、品種開発のソースとしての三倍体の新たな価値を示唆する。

1978年にイタリアでスタートした三倍体かんきつ育種プログラム⁷⁾は、数年前から、‘Tacle’などつぎつぎ新しい三倍体新品種を発表している。今後さらに、国内外で、新しい三倍体無核かんきつが増えるものと予想され、それに伴って、倍数性合成周縁キメラが広く活用されるよう期待も膨らむ。

そして、何よりもまず、ここに紹介した新しい香酸かんきつ(レモン+ライム)が近い将来新商品としてデビューし、世界で初めての倍数性合成周縁キメラかんきつの開発研究が実用化につながるよう努力している。現在、全農愛媛県本部青果事業部が栽培特性等を調査し、品種登録の出願を予定している。

この研究は、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構生研センター等により出資された(株)愛媛柑橘資源開発研究所の研究成果の一部である。

文献

- 1) Sugawara, K. et al. (2002), J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127, 104-107.
- 2) 脇塚 巧ら (2003), プレインテクノニュース 96, 9-12.
- 3) 岡田正道ら (1992), 静岡柑試研報 24, 33-38.
- 4) Frost, H.B. et al. (1942), Genetics 27, 619-634.
- 5) FAOSTAT Database 2004, <http://faostat.fao.org>
- 6) 井上(稲田)絵理子ら (2004), 園芸学雑誌 73 (別冊2), 294.
- 7) Russo, G. et al. (2004), Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura 66: 14-18.

◀文献情報▶

大麦のウドンコ病耐性機構と
その起源

A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew.

Pietro Piffalli, Luke Ramsay, Robbie Waugh, Abdellah Benabdelmouna, Angelique D'Hont, Karin Hollricher, Jergen Helms Jorgensen, Paul Schulze-Lefert and Ralph Panstruge.

Nature (2004) 430, 887-891

大麦は小麦とともに古代文明を支えた重要な栽培作物であり、6倍性小麦が出現するまでは、4倍性小麦よりも盛んに栽培されていた（田中）。大麦は節あたりに稔実する小穂によって二条性大麦と六条性大麦とに二大別されるが、六条性大麦の起源については今なお決着をみていないが、二条性大麦については二条性野生オオムギ（*Hordeum spontaneum*）より栽培化されたとされている。さて、MLO遺伝子座（遺伝子産物はカルシウム／カルモデユリン結合部位を持つ7回膜貫通の植物特異的タンパク）の機能喪失mlo11遺伝子座を持つ系統は、既知の全てのウドンコ病菌株に対して広範な抵抗性を示すことが知られている。これは、バビロフによって大麦栽培化の二次中心地と比定されたエチオピアの原始的な在来系統の中からみつかかり、今日の欧州春蒔大麦の大部分に導入されたものである。この遺伝子の起源とその作用については、今回報告された。

mlo11のMLOコード領域は野生型のそれとそんなに変わることなく、野生型遺伝子の上位に新たに挿入された縦列反復配列に、大麦の抵抗性は帰せられる。この反復配列は短縮型のMLO遺伝子であり、3.5Kbpの5'-調節領域と1.1Kbpのコード領域から成る。この反復配列がある個体ではウドンコ病菌を接種してもMLO転写産物は作られず、当然MLOタンパクも作られないが、それより高分子のRNAは作られる。ただ、野生型遺伝子とmlo11遺伝子がヘテロにあ

る場合には正常なMLOタンパクが作られ、トランスに働くジン・サイレンシングではないようである。また、復帰突然変異体（mlo11から罹病性に戻った系統）では反復配列が検出できず、シスに働く何らかの機構によるものと思われる。

さて、次のこの耐病性遺伝子が何時出現したかということであるが、大麦祖先野生種、エチオピアの在来系統および欧州栽培品種の計91系統について、MLO遺伝子の周辺25KbpをSSR、トランスポゾン分析し、系統樹を書いてみると、野生祖先種内では多型は見出せず、栽培種では多くの多型が見出せる。栽培種は大きく3つのハプロタイプに分類され、そのうちのハプロタイプIの中にmlo11が位置づけられる。これから、ウドンコ病耐性遺伝子mlo11は栽培化された後に起こった突然変異であると結論づけている。

我々はさしたる論拠もなく、病害抵抗性は栽培種よりも野生種に多く存在しているかのような気になっているが、必ずしもそうではないのだろう。思い込みは恐ろしい。

（抄訳：岩井純夫，IWAI Sumio，鹿児島大学農学部）

◀文献情報▶

3次元ゲル培養システムによるウシ胚盤胞の体外での伸長期胚への発育

Rapid growth and elongation of bovine blastocysts in vitro in a three-dimensional gel system.

Gábor Vajta^a, Natalie I. Alexopoulos^b and Henrik Callesen^a

^a Section of Reproductive Biology, Department of Animal Breeding and Genetics, Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Foulum, DK 8830, Tjele, Denmark

^b Centre for Early Human Development, Monash Institute of Reproduction and Development, Monash University, Clayton, Vic., Australia

Theriogenology, 62 (2004): 1253-1263

ウシ胚盤胞の発育と分化を促す体外培養系の確立を目指して実験を行った。体外成熟・受精後に、Well of the Well法とSubmarine Incubation法を用いて体外培養し、Day8に内部細胞塊が明瞭で品質の良好な胚盤胞期へと発生した胚を実験に用いた。スライドガラス等を用いて45mm×26mm×3mmのスペースを作るとともに、ゲルの中にトンネルを作るために直径1.2mmのガラス管を用いて、3%寒天ゲルを作製後、3等分した。作成後のゲルは、10%ウシ胎子血清、3g/LのDグルコースを含む修正合成卵管液に沈め、実験まで3日間培養液に平衡させた。ゲル1個あたり、直径約1mm、長さ12~14mmのトンネルが4~5本が作製された。各トンネルに1個ずつ、計67個の胚盤胞期胚を入れて培養した結果、69%にあたる46個の胚がDay10には、トンネルの壁に届く直径1mmまで発育した。対照区として35個の胚をトンネル外で培養したところ、46%にあたる16個が直径1mmに達した。Day12には、供試胚の52%にあたる35個の胚が1.6mm以上まで発育し、トンネルスペースを満たした（平均

2.0mm：1.6~2.9mm）。対照区のトンネル外で培養した胚においては29%にあたる10個が平均直径1.4mm（1.3~1.7mm）の球状に発育した。トンネル内培養胚のうちの24%にあたる16個の胚はさらに発育を続け、Day14には平均4.3mm（2.3~7.1mm）まで発育した。対照区のトンネル外で培養した胚においてはほんの4個が平均直径1.8mm（1.5~2.37mm）の球状に発育した。Day16においては、トンネル内培養区においては2個の胚のみが発育を続け、全長8mmと12mmまで発育し、対照区においては1個のみが3.2mmまで発育した。また、Day12において、35個中31個の胚で、栄養膜細胞の直下に新たな細胞層が出現した。増殖を続けた胚の多くで、内部細胞塊は突出してきたが、胚板の形成までには至らなかった。

体外成熟・受精・培養技術の進歩により、ウシ胚においては脱出胚盤胞期までは比較的容易に発生させられるようになった。しかし、それ以降の培養は難しく、伸長期胚へと発育させることは困難であった。今回の報告は、数は少ないものの、伸長期胚まで培養可能なことを示したものであり、今後のウシ胚の伸長や分化に関する研究を行う上で、非常に有効な手法となる可能性がある。

（抄訳：下司雅也，GESHI Masaya，独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 畜産草地研究所）

◀文献情報▶

酸素濃度を高めた人工海水中でのホタテ閉殻筋の貯蔵

Preservation of Scallop Adductor Muscle in Oxygenated Artificial Seawater.

N. Seki, T. Niki, D. Ishikawa, M. Kimura and H. Nozawa

Laboratory of marine Food Science, Graduate school of Fisheries Science, Hokkaido University, Japan

Journal of Food Science (69) 4. FCT262-267 (2004)

水産物の鮮度を保持することは、冷蔵・冷凍技術が一般的となった現在も水産業界の大きな課題である。生きた状態にできるだけ近い鮮度を保持して流通し、消費者にお届けできることが理想である。養殖が盛んとなり、より厳密な鮮度管理が可能となった今だからこそ検討できる技術課題である。鮮度保持技術を科学的に検討するためには、鮮度測定法が重要となる。鮮度を表す指標として、生体内エネルギー物質ATPから派生する各種分解物の量比から算出するK値が45年前に開発され活用されている。水産物は一般に鮮度低下が速く、死後、筋肉内のATPが急速に減少する。今、注目されているのは、鮮度に対するATPそのものの影響である。死後、ATPの再生産系が断たれるためATP濃度が減少し、それが引き金となり硬直が進行し筋肉物性や生化学的性状が変化する。

本論文では、殻から外したホタテ閉殻筋（貝柱）の鮮度保持について、各種溶液中で保存したときの効果をATP濃度や筋肉の硬直状態等を指標に測定し報告している。浸漬試験は、ホタテの血管系が開放構造であり浸漬溶液成分が直接影響することを想定している。殻から外した直後の筋肉内のATP濃度は、7.2～8 μ mol/gである。人工海水に各種アミノ酸（アルギニン、グルタミン酸、グルタミン）、トリメチルアミノオキシド（TMAO）、グルコースをそれぞれ添加したもの、あるいは、ホタテプラ

ズマ成分に浸漬し5℃で6日間保存した。その結果、人工海水に浸漬したものではATP濃度が約50%残存していた。各種アミノ酸、TMAO、グルコースの添加でATP濃度保持向上効果は認められなかった。また、ホタテプラズマ溶液保存では、ATPがほとんど残存しない結果となった。

一方、人工海水溶液の溶存酸素濃度を0.07mM、0.2mM、1 mMに調整したものに浸漬し5℃で保存したところ、ATP濃度変化に大きな差が認められた。即ち、0.07mMの溶存酸素濃度では、ATP濃度が保存2日から低下し始め5日目には完全に消失するのに対して、1 mMでは5から6日にかけてATPが残存し、7日目に完全に消失する結果となった。溶存酸素濃度0.2mMでは、この中間の消失パターンを示した。溶存酸素によるATP保持効果は、酸素存在下ATP生成酵素を阻害するナトリウムアザイド等を添加することにより失うことも確認された。以上のことから、溶液中の溶存酸素が保存中の筋肉ATP濃度に影響することが明らかとなった。

ATP濃度が低下すると、それに対応しATP由来の分解物が生成してK値は高くなり、ATP消失段階ではK値が60程度となる。また、筋肉は収縮し硬直が進む。さらに、低イオン強度溶液でのタンパク質の溶出性は低下し、タンパク質の性状等が大きく変化的ことが示された。一定濃度レベルのATPが、筋肉の物理生化学的性状を保持するために重要であることを示す結果である。

溶液中の酸素濃度が筋肉組織の鮮度維持、特にATP濃度を一定に保つために重要な役割を果たすことが明らかにされた。今後、水産物の高鮮度保持応用技術として実用化されていくことが期待される。

（抄訳：木村 郁夫，KIMURA Ikuo，日本水産株式会社中央研究所）

編集後記

第106号をお届けします。本号の総説では、高橋正昭氏（大阪府立大学）にCsNitrI形質転換植物による大気中NO₂、CO₂吸収の向上について、ご紹介戴いた。環境浄化と地球温暖化対策の双方を視野に入れた研究であり、今後の展開が注目される。その他の研究情報として、鹿内利治氏（九州大学）に光合成電子伝達の機構解明、初谷紀幸氏（京都大学）らに植物の自己防衛システムを制御する液胞プロセシング酵素、吉崎悟朗氏（東京海洋大学）らにニジマスを生むヤマメの作出など、それぞれ貴重かつ新鮮な研究情報をご紹介戴いた。地域の先端研究では、種なし果実を特集的に取り上げ、八幡茂木氏（千葉県農業総合研究センター）に種子なしビワ、徳永忠士氏（徳島県立農林水産総合技術センター）に無核スダチ、脇塚巧氏（全農愛媛県本部）らに倍数性合成周縁キメラによる種なし香酸かんきつについてご紹介戴いた。また、文献情報は、岩井純夫氏（鹿児島大学）、下司雅也氏（独・畜産草地研究所）、木村郁夫氏（日本水産株）にそれぞれご紹介戴いた。

ご多忙な中玉稿をお寄せ戴きました執筆者各位に深甚の謝意を申し上げます。

（渡辺記）

本誌著作物の複写利用等について

本誌掲載の論文・記事の複写・転載等を希望される方は、執筆者ならびに生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）の許諾を得て行って下さい。

ブレインテクノニュース 第106号

平成16年11月15日発行

発行人 津賀幸之介

編集人 吉奥 努

発行所 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

◎生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）

〒105-0001 東京都港区虎ノ門3丁目18番19号 虎ノ門マリビル10階

TEL 03-3459-6565 FAX 03-3459-6566

e-mail brainki1@ml.affrc.go.jp

URL <http://brain.naro.affrc.go.jp/tokyo/>

印刷・製本 日本印刷株式会社 〒101-0021 東京都千代田区外神田6-3-3 TEL 03-3833-6971